

**ERZİNCAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KORDON KANINDAN SAFLAŞTIRILAN KARBONİK  
ANHİDRAZ I VE II İZOENZİMLERİ ÜZERİNE BAZI  
VİTAMİNLERİN *IN VITRO* ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Ahmet ÇETİN**

**KİMYA  
ANABİLİM DALI**

**ERZİNCAN**

**2012**

Her Hakkı Saklıdır

Doç.Dr. T. Abdulkadir ÇOBAN danışmanlığında, Ahmet ÇETİN tarafından hazırlanan bu çalışma 20.06.2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Kimya Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.


Başkan : Doç.Dr. T. Abdulkadir ÇOBAN

İmza: 

Üye : Yrd.Doç.Dr. Murat ÇANKAYA

İmza: 

Üye : Yrd.Doç.Dr. Ekrem KÖKSAL

İmza: 

Yukarıdaki sonucu onaylım.

  
Doç. Dr. Çetin DOĞAR  
Enstitü Müdür V.

## ÖZET

Yüksek Lisans

### KORDON KANINDAN SAFLAŞTIRILAN KARBONİK ANHİDRAZ I VE II İZOENZİMLERİ ÜZERİNE BAZI VİTAMİNLERİN *IN VITRO* ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Ahmet Çetin

Erzincan Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. T.Abdulkadir ÇOBAN

Karbonik anhidraz (E.C.4.2.1.1 karbonat dehidrataz) bütün organizmalarda yaygın olarak bulunan ve aktif bölgesinde  $Zn^{+2}$  iyonu içeren bir metaloenzimdir. Karbonik anhidraz (CA), canlılarda  $CO_2$ 'nin hidrasyonu ve  $HCO_3^-$ 'in dehidrasyon reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen önemli bir enzimdir.

Kordon kanı fetüsün beslenmesinde, gaz alış-verişinde ve atık maddelerin gideriminde büyük bir öneme sahiptir. Karbonik anhidraz enziminin fizyolojik işlevleri göz önüne alındığında kordon kanındaki önemi ortaya çıkmaktadır. Oksijenin fetüse gönderilmesi ve karbondioksitin fetüsten atılması sırasında, kan-doku bariyeri pH dengesinin istenilen değerlerde tutulmasından sorumlu olan karbonik anhidraz, fetüs gelişimde önemli rol oynamaktadır.

Hamilelik süresince kullanılan doğal ve sentetik vitaminler fetüsün gelişimi için önemlidir. Kullanılan vitaminlerin karbonik anhidrazın aktivitesin üzerine yaptığı etki önem arz etmektedir.

Bu çalışmamızda kordon kanından karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerini (hcbCA I ve hcbCA II) afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda saflaştırılan hcbCA I ve II izoenzimleri üzerine, hamilelik süresince kullanılan vitaminlerin *in vitro* şartlarda inhibisyon etkileri incelenmiştir. Çalışmamızdaki amaç; hamilelik süresince kullanılan bu vitaminlerin, fizyolojik olarak önem arzeden CA I ve II izoenzimlerine etkisinin incelenmesidir.

**2012, 98 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Karbonik anhidraz, Kordon kanı, Vitamin, Afinite Kromatografisi.

## ABSTRACT

Master Thesis

### INVESTIGATION OF *IN VITRO* EFFECTS OF SOME VITAMINS ON CARBONIC ANHYDRASE I AND II ISOENZYMES WHICH PURIFIED FROM CORD BLOOD

Ahmet Çetin

Erzincan University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Assoc.Prof. Dr. T.Abdulkadir ÇOBAN

Carbonic anhydrase (EC 4.2.1.1 carbonate dehydratase) a metalloenzyme, commonly found in all organisms which containing  $Zn^{+2}$  ions in its active side. Carbonic anhydrase (CA) is an important enzyme for all organisms which catalyzes reversible hydration of  $CO_2$  and dehydration of  $HCO_3^-$  reactions.

Cord blood has a great importance in; fetal feeding, gas exchange and in the removal of waste materials. Considering the physiological functions of carbonic anhydrase, importance for cord blood is emerging. During the sending of oxygen to the fetus and disposal of the carbon dioxide from fetus, carbonic anhydrase which is responsible for keeping the balance of pH of the blood-tissue barrier plays an important role in fetal development.

During pregnancy, use of natural and synthetic vitamins are important for the development of the fetus. Vitamins which used in, is important for effects on the activity of carbonic anhydrase

In this study, cord blood carbonic anhydrase I and II isoenzymes (hcbCA I and hcbCA II) were purified by affinity chromatography method. At the same time, on purified hcbCA I and II isoenzymes, we investigated in vitro inhibitory effect of some vitamins which is used during pregnancy. Purpose of our study,these vitamins which is used during pregnancy ,to investigate the effect of hcbCA I and II isoenzymes which have important physiologically task.

**2012, 98 pages**

**Keywords:** Carbonic anhydrase, Cord blood, vitamin, Affinity chromatography

## TEŞEKKÜR

Deneysel kısmını Erzincan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakóltesi Biyoloji Laboratuvarında gerçekleştirdiğim bu Yüksek Lisans Tezi Çalışmamda engin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, tezimin her aşamasında bilgisini ve tecrübesini benden esirgemeyen her türlü yardım ve desteğini veren tez danışmanım değerli hocam Sayın Doç. Dr. T. Abdulkadir ÇOBAN'a derin minnet ve Őükranlarımı sunarım. Çalışmam boyunca eşsiz katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Murat ÇANKAYA'ya tüm içtenliklerimle teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans dönemim boyunca her türlü yardımı esirgemeyen, Moleküler Biyoloji A.B.D. araştırma laboratuvarında deneysel ve teorik çalışmalarında yardımcı olan Erzincan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakóltesi Biyoloji Bölümü asistanlarından Arş.Gör. Mehmet KUZUCU 'ya teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışmalarım boyunca benden manevi desteğini esirgemeyen eşim Ebru ÇETİN'e sonsuz teşekkürler ederim.

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER	vii
KISALTMALAR LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1.Kordon Kanı	1
1.1.1. Kordon Kanının Özellikleri	2
1.1.2. Morfolojik Özellikleri	4
1.1.3. Kök Hücre	5
1.1.4.Kök hücrenin sahip olduğu bazı özellikler	6
1.1.4.1. Kendi-Kendini Yenileme	6
1.1.4.2. Klonlaşma	6
1.1.4.3. Farklılaşma	6
1.1.5. Kordon Kanının Toplanması	7
1.2. Enzimler	9
1.2.1. Enzim İnhibisyonu	16
1.3. Afinite kromatografisi	19
1.3.1. Matriks	21
1.3.2. Ligand	22
1.3.3. Uzantı Kolu	23
1.3.4. Ligandı Bağlayacak Jelin Seçimi	23
1.3.5. Afinite Kromatografisi Türleri	25
1.4. Karbonik Anhidraz	26
1.4.1. Fizyolojik Fonksiyonları	26
1.4.2. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri	28
1.4.3. Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Üç Boyutlu Yapıları	31

1.4.3.1. $\alpha$ -Karbonik anhidrazlar	32
1.4.3.2. $\beta$ -Karbonik anhidrazlar	33
1.4.3.3. $\gamma$ -Karbonik anhidrazlar	34
1.4.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar	34
1.4.5. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması	35
1.4.6. Karbonik Anhidrazın Önemli İnhibitörleri	38
1.5. Deneyde kullanılan vitaminler ve özellikleri	42
1.5.1. K vitamini	42
1.5.2. A vitamini	45
1.5.3. B-12 vitamini	44
1.6. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayin Metodları	50
1.6.1. Esteraz Aktivitesi	50
2. KAYNAK ÖZETLERİ	51
3. MATERYAL ve YÖNTEM	54
3.1. Materyal	54
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	54
3.1.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar	55
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	55
3.2. Yöntem	58
3.2.1. Protein Tayini	58
3.2.1.1. Kalitatif protein tayini	58
3.2.1.2. Bradford yöntemi ile protein tayini	58
3.2.2. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayini	59
3.2.2.1. Esteraz aktivitesi tayini	59
3.2.3. Sepharose 4B-L-tirozin-sulfanilamid Afinite Jelinin Sentezi	60
3.2.3.1. CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye Tirozin Bağlanması	61
3.2.3.2. p-aminobenzensülfonamidin Kenetlenmesi	61
3.2.4. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü	62
3.2.5. Kordon kanından Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Saflaştırılması	63
3.2.5.1. Kordon kanı temini ve hemolizat hazırlanması	63
3.2.5.2. Afinite kolonunun paketlenmesi	64

3.2.5.3. Afinite kolonuna numune tatbiki ve elüsyonu	64
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	65
4.1. Sonuçlar	65
4.1.1. Saflaştırma sonuçları	65
4.1.2. İnhibisyon çalışmaları sonuçları	66
4.2. Tartışma	75
KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ	98



**SİMGELER LİSTESİ**

L	Litre
mL	Mililitre
$\mu$ L	Mikrolitre
$\mu$ g	Mikrogram
$\mu$ M	Mikromolar
rpm	Devir/Dakika

**KISALTMALAR LİSTESİ**

CA	Karbonik anhidraz enzimi
HCA	İnsan karbonik anhidraz enzimi
CARP	Protein bağlı karbonik anhidraz
CFU-GEMM	Colony-forming units granulocyte / erythrocyte / macrophage / megakaryocyte
CFU-GM:	Colony-forming units granulocyte / macrophage
D.H	Dendritik hücre
E. C	Enzim kod numarası
E. U	Enzim ünitesi
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
EI	Enzim inhibitör kompleksi
ESI	Enzim inhibitör substrat kompleksi
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
GvHD	Graft-versus-host-disease
HES	Hydroxy ethyl starch
HKH	Hematopoetik kök hücre
IF	İntrinsik faktör
IL	İnterlökin
MNH	Mononükleer hücre
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PER	Amonyum persülfat
P.K	Perifer kan
SDS	Sodyum dodesilsülfat
TC	Transkobalamin
TCA	Triklor asetik asit
TEMED	N,N,N',N'-tetramet etilendiamin
Tris	Trihidroksimetilaminometan

**ŞEKİLLER LİSTESİ****Sayfa**

Şekil 1. 1. Umbilikal kordun histolojik kesit görüntüsü	1
Şekil 1. 2. Göbek kordonundan kan alınması	2
Şekil 1. 3. İnsan Doku Farklılaşması	7
Şekil 1. 4. Michaelis-Menten grafiği	14
Şekil 1. 5. Lineweaver-Burk grafiği	15
Şekil 1. 6. Yarışmalı inhibisyon şematik şekli	16
Şekil 1. 7. Yarışmasız inhibisyon şematik şekli	17
Şekil 1. 8. Yarı yarışmalı inhibisyon şematik şekli	18
Şekil 1. 9. Afinite kromatografisinin prensibi	21
Şekil 1.10. Eritrosit membranının klorür-bikarbonat değiştiricisi	28
Şekil 1.11. Bazı CA izoenzimleri içinde katalitik olarak aktif CA izozimlerinin şematik olarak hücredeki yerleşimleri	29
Şekil 1.12. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin katalitik bölgeleri	32
Şekil 1.13. CA enziminin CO <sub>2</sub> -hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik gösterilişi	36
Şekil 1.14. CAII nin aktif kısmı	37
Şekil 1.15. CA-II ile inhibitörler arasındaki komplekslerin yapılarının şematik çizimleri	39
Şekil 1.16. Bazı Sülfamidlerin açık formülleri	40
Şekil 1.17. Sülfamidlerin Karbonik Anhidraz Enzimine Bağlanması	42
Şekil 1.18. K vitamininin molekül yapısı	44
Şekil 1.19. A vitamininin molekül yapısı	46
Şekil 1.20. B-12 vitamininin molekül yapısı	49
Şekil 3. 1. Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için kullanılan afinite jelinin kimyasal yapısı	60

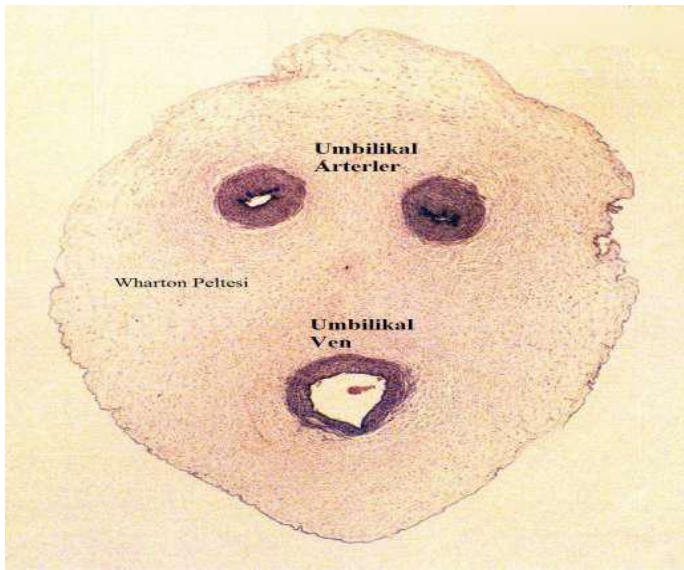
Şekil 4. 1. Saflaştırılmış hcbCA izoenzimlerinin SDS-PAGE görüntüsü	66
Şekil 4. 2. B-12 vitamininin hcbCA I izoenzime karşı $IC_{50}$ grafiği	68
Şekil 4. 3. A vitamininin hcbCA I izoenzime karşı $IC_{50}$ grafiği	68
Şekil 4. 4. K vitamininin hcbCA I izoenzime karşı $IC_{50}$ grafiği	69
Şekil 4. 5. B-12 vitamininin hcbCA II izoenzime karşı $IC_{50}$ grafiği	69
Şekil 4. 6. A vitamininin hcbCA II izoenzime karşı $IC_{50}$ grafiği	70
Şekil 4. 7. K vitamininin hcbCA II izoenzime karşı $IC_{50}$ grafiği	70
Şekil 4. 8. B-12 vitamininin hcbCA I izoenzime karşı $K_i$ grafiği	71
Şekil 4. 9. A vitamininin hcbCA I izoenzime karşı $K_i$ grafiği	72
Şekil 4.10. K vitamininin hcbCA I izoenzime karşı $K_i$ grafiği	72
Şekil 4.11. B-12 vitamininin hcbCA II izoenzime karşı $K_i$ grafiği	73
Şekil 4.12. A vitamininin hcbCA II izoenzime karşı $K_i$ grafiği	73
Şekil 4.13. K vitamininin hcbCA II izoenzime karşı $K_i$ grafiği	74

<b>TABLULAR LİSTESİ</b>	<b>Sayfa</b>
Tablo 1. 1. Afinite kromatografisinde en sık kullanılan biyolojik sistemler	21
Tablo 1. 2. Ligandları immobilize etmek için kullanılan gruplar ve bağlandıkları jeller	24
Tablo 1. 3. Karbonik anhidraz izoenzimleri	31
Tablo 1. 4. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri	35
Tablo 1. 5. Karbonik Anhidraz izoenzimlerinin Hücre içi Yerleşimleri ve Sülfonamidlere ilgisi	41
Tablo 4.1. Kordon kanı CA-I izoenziminin afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları	65
Tablo 4. 2. Kordon kanı CA-II izoenziminin afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamakları	65
Tablo 4. 3. Denemesi yapılan vitaminlerin $IC_{50}$ değerleri	71
Tablo 4. 4. Denemesi yapılan vitaminlerin $K_i$ değerleri	74

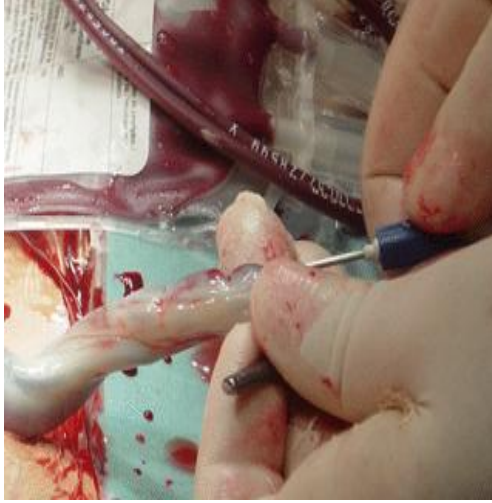
# 1. GİRİŞ

## 1.1.Kordon Kanı

Plasenta, anne ile bebek arasındaki madde alışverişinin gerçekleştiği yapıdır. Bebek, gebelik süresince plasentaya göbek kordonu ile bağlıdır. Göbek kordonunun görevi plasenta ve bebek arasındaki damarların korunmasıdır. Kordon içerisinde 2 umbilikal arter ve 1 umbilikal ven olmak üzere toplam 3 adet damar bulunur. Bu damarlar Wharton Jeli adı verilen jöle kıvamında bir madde tarafından çevrelenmiştir. Bu jel son derece kritik bir yapıya sahiptir ve yastık görevi görmek gibi çok önemli bir fonksiyonu vardır: Bu özel yapı sayesinde göbek kordonunda gerçek bir düğüm olsa bile kordon tam anlamıyla sıkışmaz. Düğümün iki ucundaki kuvvet ortadan kalktığı anda düğüm hemen gevşer. Bu özellik içindeki damarların korunması açısından mükemmel fonksiyon görür. Kordon içindeki 2 arter bebeğin dolaşımındaki karbondioksit ve diğer atıkları plasentaya taşıırken tek bir tane olan vendeki akım plasentadan bebeğe doğrudur ve oksijen ile besin maddelerinden zengin kan taşır. Plasenta ile bebek arasında bağlantıyı sağlayan damarların içinde kordon kanı ve bu kanın içindedeki kök hücreler bulunmaktadır.



Şekil 1.1. Umbilikal kordon histolojik kesit görüntüsü



**Şekil.1.2.** Göbek kordonundan kan alınması

### 1.1.1. Kordon Kanının Özellikleri

Kordon kanı (K.K), yetişkin kanına göre birçok farklılığa sahiptir. Term kordon kanının İçerdiği CFU-GM, CFU-GEMM sayı ve çoğalma hızlarının, yetişkin kanına göre çok daha fazla olduğu belirlenmiştir (Mitchell and John, 1997). Hem term hem de preterm kordon kanı, yetişkin kanından daha fazla öncül kök hücre içermekte ve bu özelliği ile de buldukları çevreye daha kolay uyum sağlamaktadır (Cohen ve Dominguez, 1998; Gluckman ve Rocha, 1998).

Periferel kan (P.K) ile karşılaştırıldığında, kordon kanında sitokin üretimi daha düşük olmasına rağmen, sitokinlere hızlı cevap verirler. Böylece kültürde çoğalma yetenekleri de yükselmiş olmaktadır (Bertonoli *et al*, 1994; Bradley ve Cairo, 2005; Cairo ve Wagner, 1997 )

CD34+ kemik iliği (K.İ) ve K.K. kök hücreleri değişik olgunlaşma reseptörleri ile birbirinden ayrılırlar. CD34+ K.K. hücrelerinde CD10 ve CD19 daha az iken, kemik iliği hücrelerinin %15-25'inde bu reseptörler bulunmaktadır. K.K. CD34+ hücrelerinin çoğunda CD13 eksprese edilirken, öncül hücrelerde bulunmayan CD33 ekspresyonu yoktur (Qian *et al*, 1997; Van Epps *et al*, 1994).

Kordon kanı CD34+ hücreleri, Hematopoetik kök hücre (HKH)'lerin proliferasyonunda ve canlılığının devamında önemli rolü olan c-kit reseptörünü (CD117) %60 oranında, hematopoezin erken evrelerinde etkili olan Flt-3 ligand (FL) ve reseptörü Flt-3 (CD135) "ü beraber bulundurmaktadırlar (Dorrell *et al*, 2000).

Çalışmalarda, kordon kanındaki CD34+ hücre sayısı, kemik iliğine göre %1-2 oranında daha düşüktür. Bununla birlikte kordon kanı kök hücrelerinin daha öncül yapıda olmasını sağlayan CD34+CD38- hücrelerin oranı daha fazladır. Bu hücreler, sitokin uyarılarında daha hızlı proliferasyon olmaktadır (Belvedere *et al*, 2000; Dorrell *et al*, 2000; Kreissig *et al*, 1994).

Kordon kanı CD34+ hücreleri IL-11 ve G-CSF ile uyarılarak yapılan 14 günlük kültür sonucunda, kemik iliği CD34+ hücrelerine oranla 80 kat daha fazla çoğaldıkları belirlenmiştir (Van de *et al*, 1995).

Uzun süreli kültürlerde ise CD34+CD38- hücrelerinin çoğalma oranı, kemik iliğine göre 7 kat fazladır. Bu durum kordon kanı kök hücrelerinin kemik iliğine yerleşim ve çoğalma yeteneklerinin daha fazla olduğunu anlatmaktadır. CD34+CD38+ hücrelerinin, olgunlaşmamış hücrelerin yaşaması ve proliferasyonu için destek sağladığını gösteren bir çalışmada; CD34+ hücrelerden CD38 negatif seleksiyonu yapılan hücre popülasyonuna kıyasla, CD34+ hücrelerin fetal kemik iliğinde çoğalması 10 kat daha fazla bulunmuştur (Süzergöz, 2002).

Ayrıca kordon kanındaki dendritik hücreler, yenidoğanın zayıf immün cevabında pay sahibidir. Allojenik kordon kanı nakillerinde, bu sayede daha düşük oranda Graft versus host hastalığı (GvHD) görülmektedir. Dendritik hücre (D.H)"ler, immün cevabı başlatacak olan "antigen presenting" (antijen sunan) hücrelerdir (Langrish *et al*, 2002).

Kordon kanı hücrelerinin temel avantajlarından birisi de çekirdeklerinde gizlidir. Bu hücreler, oldukça uzun telomere sahiptirler ve doğumdan önce sınırlı sayıda bölünme geçirmişlerdir. Replikasyon potansiyeli, telomerlerin uzunluğu ile ölçülmektedir. Telomerler her bölünme sonrası kısalmakta ve zamanla kısalan telomerler hücreleri bloke etmekte veya ölümüne neden olmaktadır (Vaziri *et al*, 1994).

### 1.1.2. Morfolojik Özellikleri

Fazla sayıda olmamakla birlikte, yapılan elektron mikroskop çalışmalarında, kordon kanı hücrelerinin morfolojileri belirlenmek istenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda periferik kan hücrelerinden farklılıklar ortaya konmuştur. Kordon kanı, periferik kana zıt olarak miyelosit evresi ve promiyelosit gibi immatür hücreler içermektedir. Olgun nötrofiller, sıklıkla “nuclear pocket” içerir ve apoptozun morfolojik özellikleri olan kromatin kondensasyonu ile şapka biçimli kromatin marjinasyonu göstermektedir. “Nuclear pocket” oluşumları, çekirdek ve sitoplazma arasındaki iletişim yüzeyini arttırarak nükleoplazmik etkileşimleri yükseltmektedir (Burns *et al*,1971).

Apoptozun erken evresini tanımlayan morfolojik özellikler ise doğumdan sonra meydana gelen nötrofil yoğunluğundaki hızlı azalma ile bağlantıyı ortaya koymaktadır (Kerr *et al*,1972; Mikami *et al*, 1998). Bazı eozinofiller, tek sitoplazmik granül içinde birkaç adet kristalloid içermektedir.

Bu durum kordon kanı eozinofillerinin granül oluşumu yolunda normal olgunlaşma sürecine girmediğini göstermektedir. Bazı bazofiller ise, granüllerindeki lamellar yapıların varlığıyla belirlenen dejenerasyon aşamasında olabilmektedirler. Kordon kanı bazofilleri, periferik kanla kıyaslandığında daha immatür yapıda ve fazla sayıdadırlar.



Seyrek kromatinli yuvarlak çekirdek, geniş sitoplâzma ve az gelişmiş organelleri ile bir miktar immatür miyeloblast gözlemlenebilmektedir. Kordon kanı bazı atipik lenfositler içermektedir. Bu lenfositler yonca yaprağı şekliyle kendini gösteren, deformasyon sürecine girmiş, derin bir yarığa sahip çekirdekli hücrelerdir. Buna ek olarak, çekirdekçiğe sahip çok sayıda immatür lenfosit de bulunmaktadır.

Kordon kanı, periferik kanda bulunmayan sadece kemik iliğinde tanımlanan eritroblastları içermektedir. Bu durum hematopoezin çok aktif olduğuna işaret etmektedir. Mitekondri bulunduran çok sayıda eritrosit ise, retikülositler gibi olgunlaşmamış eritrositlerin kordon kanında çok sayıda olduğunu göstermektedir. Kordon kanında ayrıca 10µm'den büyük çapta dev plateletler de görülmüştür. Bu büyük plateletler, megakaryositlerdeki demarkasyon membranının anormal oluşumuna işaret etmektedir.

Yapılan çalışmalarda kordon kanı hücrelerinde, kemik iliğinin tersine zayıf bir peroksidaz reaksiyonu görülmüştür. Bazı hücrelerde pozitif reaksiyon veren granüller tanımlanmıştır(Harris *et al*, 1994).

### 1.1.3. Kök Hücre

Kök hücreler organizmanın yaşamı boyunca belirsiz periyotlarla sık sık bölünme (kendi kopyasını oluşturma – Self reniuel ) yeteneğine sahip hücrelerdir. Doğru koşullar altında veya doğru sinyaller verildiğinde organizmayı oluşturan birçok farklı hücre tipine dönüşebilirler ( Farklılaşabilme – Diferansiasyon ). Yani kök hücreler, karakteristik şekil ve özelleşmiş fonksiyonlara sahip, kalp, deri ve sinir hücreleri gibi olgunlaşmış hücrelere gelişebilme potansiyeline sahiptirler (Kirschste ve Skirboll, 2001).

#### **1.1.4.Kök hücrenin sahip olduğu bazı özellikler**

##### **1.1.4.1. Kendi-Kendini Yenileme**

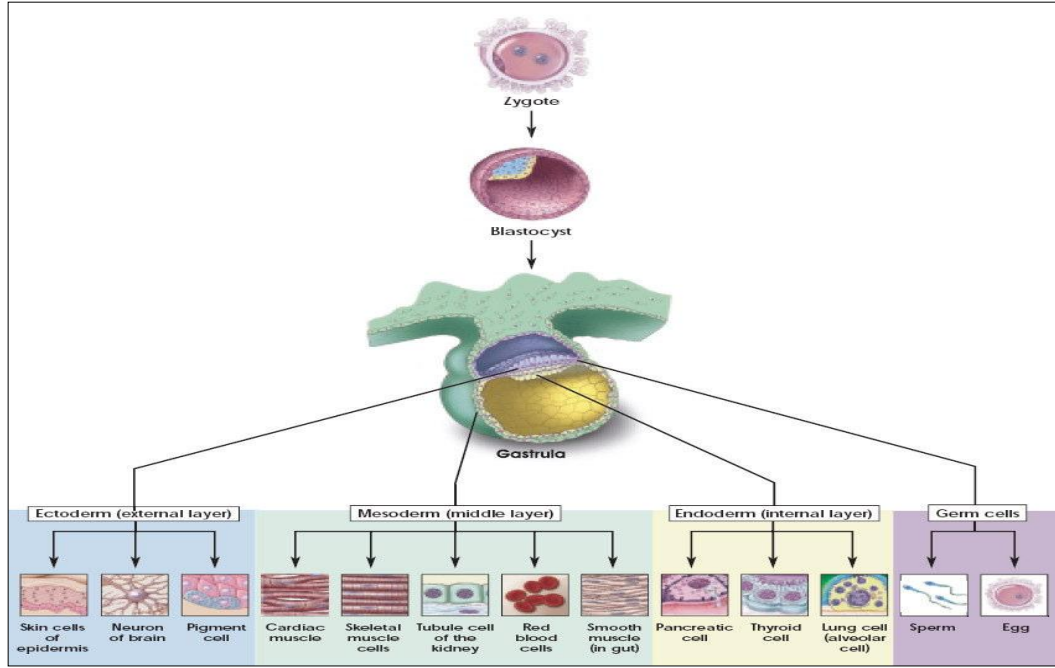
Kendi kendini yenileme terimi hücrenin üreme faaliyetleri ile ilgili olup, kök hücreler bu faaliyetleri bakımından ölümsüz, sürekli ve limitsiz bölünme yeteneklerine sahip olarak değerlendirilebilirler. Houck ve arkadaşlarının yaptığı in-vitro çalışmalarda (Houck et al,1971) çeşitli somatik hücrelerin en fazla 80 ikilenme gösterdiği, daha sonra üremenin yaşlanma ve replikatif kısıtlamalar sonucunda sınırlandığı gösterilmiştir. Bu nedenlerle sınırsız kendini yenileme yeteneğine sahip olan bir kök hücrenin onkojenik transformasyon olmadan en az 160 ikilenme göstermesi gerekmektedir.

##### **1.1.4.2. Klonlaşma**

Bir kök hücrenin sahip olması gereken önemli özelliklerden birisi olarak değerlendirilmektedir. Klonlaşma bir hücrenin aynı yapıda birden fazla hücreyi üretme kapasitesi olarak adlandırılmaktadır. Klonlaşma özelliği ile hücreler homojen formda hücre grupları oluşturabilmektedir. Bu özellik bir hücre hattı oluşumunda kritik parametredir (Handbook, 2004).

##### **1.1.4.3. Farklılaşma**

Kök hücreler kendi kendini yenileme ve doku ve organ yapılarını oluşturabilecek yeni hücrelere farklılaşabilme yetisine sahip hücreler olarak tanımlanabilmeleri yönünde kullanılan bu basit ama yaygın tanım, embriyonik ve fetus kaynaklı kök hücreler için sürekli olarak geçerli olabilmektedir fakat sınırlı farklılaşma ve kendini yenileme kapasitesine sahip olan yetişkin kök hücreler için yeterli olmamaktadır. Bu nedenle kök hücreleri tanımlarken göz önünde bulunması gereken diğer bir terim potansiyeldir. Yani bir kök hücrenin farklılaşma potansiyelidir. Bu özelliğe bağlı olarak kök hücreler çeşitli sınıflandırmalara ayrılırlar (Kirschste ve Skirboll, 2001).



**Şekil 1.3.** İnsan Doku Farklılaşması (Kirschste ve Skirboll, 2001).

### 1.1.5. Kordon Kanının Toplanması

Umbilikal kordon kanının toplanmasında kullanılan 2 ana yöntem vardır;

1. Plasenta geldikten sonra (ex utero) (Fraser *et al*, 1998).
2. Bebeğin doğumundan sonra, fakat plasantanın ayrılmasından önce yani in utero (Ballen *et al*, 2001).

İki yöntem kıyaslandığında in utero teknikle toplanan örneklerde mononükleer hücre (MNH) sayısı daha fazla bulunmuştur (Surbek *et al*, 1998). Kordon kanı elde etmede, nispeten yüksek trombosit ve çekirdekli eritroid öncülleri içermesi MNH izolasyonuna negatif etki yapmaktadır. Bu nedenle periferik kan için standart olan bazı elde etme ve hücre ayırma protokolleri kordon kanı için yeterince iyi çalışmamaktadır (Kekarainen *et al*, 2006).

Umbilikal kord, ortalama 56cm'dir ve Şekil 2-3'de gösterildiği gibi, histolojik olarak iki arter, bir venden oluşmaktadır. Kordon kanı, umbilikal venden iğne aspirasyonu ile toplanmaktadır. Ortalama olarak 100-120ml kan toplanabilir. Tek bir toplama sonucu elde edilen çekirdekli hücre sayısı  $4,7 \times 10^8$  ile  $4,6 \times 10^9$  arasında değişmektedir (Mitchell and John, 1997).

Yapılan bir çalışmada, maternal yaşın hiçbir parametre üzerinde etkisinin bulunmadığı ancak, ilk bebeklerin ve kiloca büyük bebeklerin daha fazla çekirdekli hücre, CD34+ hücre ve CFU-GM'ye sahip oldukları gösterilmiştir. Kiloda meydana gelen her 500gr'lık artış için ortalama olarak, total çekirdekli hücre sayısı %10, CD34+ miktarı %28 ve CFU-GM ise %21 artmaktadır. Aynı çalışmada, sigara içen annelerin kordon kanında daha az CD34+ hücre bulunmuştur (Ballen *et al*, 2001). Bertolini ve arkadaşları, normal doğum (in utero) veya sezeryan doğumlar (ex utero) arasında toplanan kan miktarı açısından anlamlı bir fark gösterememiştir (Bradley ve Cairo, 2005). Bununla birlikte, 1993-1999 yılları arasında New York hastanelerinde yapılan bir çalışmada, kordon kanı miktarını etkileyen faktörler ortaya konmuştur;

- Doğum şekli
- Kordon uzunluğu
- İndüksiyon
- Kan toplama süresi
- Bebek ağırlığı
- Çoğul gebelikler
- Plasenta ağırlığı
- Doğum süresi

Irklar karşılaştırıldığında ise beyaz ırkın Afrikalı, Amerikalı veya Asyalılara göre daha fazla kordon kanına sahip oldukları görülmüştür. Toplanan miktarı artırabilmek için iğne giriş yerini de göz önüne alarak, kordonun mümkün olduğunca uzun tutulması ve en hızlı sürede toplanması önemli unsurlardır (Jones *et al*, 2003; Surbek ve Holzgrave, 2001).

Değişik toplama yöntemlerindeki amaç optimizasyonu sağlamak, mikrobiyal ve maternal hücre kontaminasyonlarını azaltmaktır (Harris *et al*, 1994; Turner *et al*, 1992). Kapalı toplama sistemleri kordon kanı toplama merkezlerinde, eğitimli elemanlar tarafından kullanılmaktadır.

Açık toplama sistemleri, teknik olarak daha kolay olmakla birlikte en önemli dezavantajları yüksek kontaminasyon riskidir. Maternal hücre kontaminasyonu, toplama esnasında gerçekleşen, klinik önemi kısıtlayıcı bir etken olarak karşımıza çıkmaktadır (Mitchell and John, 1997). Bunun yanında açık ve kapalı sistemler arasında, toplanan kan miktarı olarak büyük farklılıklar görülmemiştir (Bradley ve Cairo, 2005)

Toplanan kandan çeşitli yollarla çekirdekli hücreler elde edilmektedir. Broxymeyer ve arkadaşları, “density-gradient” santrifügasyonu ile hücre elde edilirken, büyük miktarlarda hücre kaybının olduğunu tespit etmiştir (Broxsmeyer *et al*, 1989). Yapılan çalışmada kan örneklerinin işlemlerden önce 12 saat bekletilmesinin, yöntemin etkinliğini azalttığı görülmüştür. Rubinstein ve arkadaşları, kırmızı hücrelerin ayrılmasında HES kullanarak %98 oranında koloni oluşturan hücre yenilenmesi elde edilmiştir (Rubinstein *et al*, 1995).

## **1.2. Enzimler:**

Enzimler canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşmasına izin vermeden % 100'lük bir ürün verimi alınmasını sağlayan, protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir. Proteinlerin en büyük ve en çok özelleşmiş grubunu teşkil ederler (Keha ve Küfrevioğlu,2005),, enzimlerin gerçekleştirdiği tepkimeler invitro şartlarda gerçekleşen aynı tepkimeye göre milyonlarca hatta milyarlarca kat daha fazladır. Enzimler, hücresel tepkimelerin hızını hücrenin gereksinimlerine göre ayarlar. Bunun için belli hücresel bölgelere yerleşir ve yüksek ölçüde spesifiklik gösterirler. Enzimler tepkime sırasında tüketilmezler ve reaksiyon sonunda değişikliğe uğramazlar (Konukoğlu, 2000).

Biyolojik kataliz, ilk olarak midenin salgıları ile etin sindirimi üzerine yapılan çalışmalarda 1700'lerin sonunda keşfedildi ve tanımlandı. Sonraki araştırmalar 1800'lerde tükürük ve çeşitli bitki özütleriyle, nişastanın şekere dönüşümü çalışmalarıyla devam ettirildi. 1850'lerde Louis Pasteur şekerin mayayla alkole fermentlenmesinin "fermentler" tarafından katalizlendiği sonucuna vardı. Eduard Buchner maya özütlerinin, şekeri alkole fermentlediğini, bu işlevinde moleküller tarafından sağlandığını keşfetti. Frederic W. Kühne bu moleküllerin enzimler olduğunu ileri sürdü. James Sumner tarafından 1926'da üreazın kristallendirilmesi ve izolasyonu ile enzim çalışmalarında yeni bir açılım sağladı (Nelson ve Cox, 2005). 1934'lerde Herriott ve Northrop Enziminin yapısındaki bazı fonksiyonel grupları bloke ettiklerinde, enzim aktivitesinin kaybolduğunu belirtmişlerdir. Bazı araştırmacılar 1902 yılında Enzim ve Substrat ile Enzim-Substrat kompleksi arasında bir dengenin olduğunu ileri sürmüşlerdir. Daha sonra Michaelis-Menten bu tanımları daha fazla genişleterek bugün kendi adlarıyla anılan Michaelis-Menten denklemini ortaya çıkartmışlardır (Colowick ve Kaplan, 1987).

1894 yıllarında Chittenden'nin enzimler ile ilgili ileri sürdüğü üç kavram enzimoloji Tarihin de bir dönüm noktası olmuştur. Bunlar;

- 1) Enzimler proteinden oluşmuştur.
- 2) Katalitik aktivite bir bakıma enzim proteininin özel yapısına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır.
- 3) Enzimler pasif katalizörler değildir, substratları ile ara kompleksler oluşturarak görev yapan aktif moleküllerdir.

Bu kavramların, bugün enzimler hakkındaki bilgilerimizle çelişki göstermediği belirtilmektedir (Gözükara, 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, tiamin pirofosfat; aldehytler, koenzim A; 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 ürüne dönüştürdükleri maddelere, substrat denir. Enzimlerle ilgili yapılan ilk çalışmalarda, enzimin etki ettiği substrat adının sonuna -az eki getirilerek (Üreaz, lipaz, fosfataz v.b.) veya genel adlarıyla (pepsin, tripsin gibi) isimlendirilirken, günümüzde Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından yapılan sistematik sınıflandırmaya göre isimlendirilmektedir. Bu sınıflandırmada her enzim dört rakamlı bir kod numarası ile (E.C.) tanımlanmıştır (Lehninger, 2011; Bingöl, 1983; Tekman ve Öner, 1986; Keha ve Küfrevioğlu, 2010).

Bugün yaklaşık 2000 kadar farklı enzim bilinmektedir. Enzimlerin hem reaksiyon özgüllüklerini hem de substrat özgüllüklerini dikkate alan bir sınıflandırma geliştirilmiştir. Bu sınıflandırmaya göre tüm enzimler enzim kataloğuna, dört basamaklı bir sayı olan EC numarası altında girerler. İlk basamak 6 temel sınıftan birine üyeliği belirtirken sonraki ikisi alt sınıfları ve alt-alt sınıfları belirtir. Son basamak ise enzimin alt sınıftaki sırasını gösterir.

Altı temel sınıfın her biri, aynı reaksiyon özgülüğüne sahip enzimleri içerir. Oksidoredüktazlar (sınıf 1), bir redoks sisteminden diğerine indirgeyici ekivalentleri katalizlerler. Transferazlar (sınıf 2) bir substrattan diğerine hidrojen dışındaki diğer fonksiyonel grupların transferini katalizlerler.

Çoğu oksidoredüktazların ve transferazların koenzimlere gereksinimi vardır. Hidrolazlarda (sınıf 3) grup transferinde rol alırlar ancak alıcı her zaman bir su molekülüdür. Liyazlar (sınıf 4) bir çift bağın uzaklaştırılması veya oluşumu ile ilgili reaksiyonları katalizlerler. İzomerazlar (sınıf 5) geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalizleyen enzimlerdir. Ligazlar (sınıf 6, sentetazlar) tarafından katalizlenen reaksiyonlar, enerji bağımlıdır. Bu nedenle, her zaman nükleosit trifosfatların hidrolizi ile birlikte gerçekleşir (Koolman *et al.*, 2003; Keha ve Küfrevioğlu, 2010).

Günümüzde birçok enzim saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve 200'den fazla enzim de kristalleştirilmiştir. Yapılan genetik çalışmalar ve hücre içindeki kimyasal reaksiyonların çeşitliliği daha birçok enzimin keşfedilmediğini göstermektedir. Bütün canlı hücrelerde meydana gelen reaksiyonlar enzimlerle ilgilidir.

Enzimler canlı hücrelerde sentezlenir ve hücre canlılığını yitirdikten sonra uzun süre etkili kalırlar. Katalitik etkileri hücreye bağlı değildir. Enzimler, protein yapısında olduklarından protein özelliklerine sahiptirler.

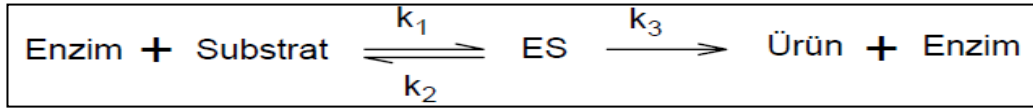
Enzimlerin katalizleme güçleri "turnover sayısı" adı verilen bir değerle ifade edilir ve birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısı demektir.



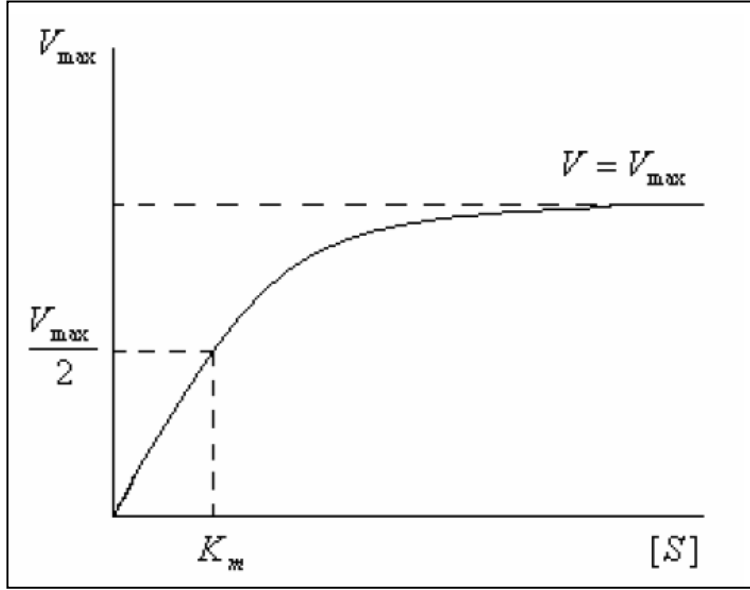
Enzim aktivitesine yani enzimli reaksiyon hızlarına etki eden faktörleri şöyle sıralayabiliriz:

- a. Substrat konsantrasyonu
- b. Enzim konsantrasyonu
- c. pH
- d. İyonik şiddet
- e. İnhibitor ve aktivatörlerin varlığı
- f. Sıcaklık

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 başlangıç enzim derişimi sabit alınıp reaksiyon hızının substrat derişimine bağılılığı incelenir. Sonuçta hiperbolik bir fonksiyon ve eğri elde edilir (Şekil 1.4.). Bunun çözümü ile Michaelis-Menten bağıntısı bulunur.



Şekil 1.4. Michaelis-Menten grafiği.

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

$V_{\max}$ : hiperbol asimtodunun y eksenini kestiği noktadır ve maksimum hız olarak belirtilir.

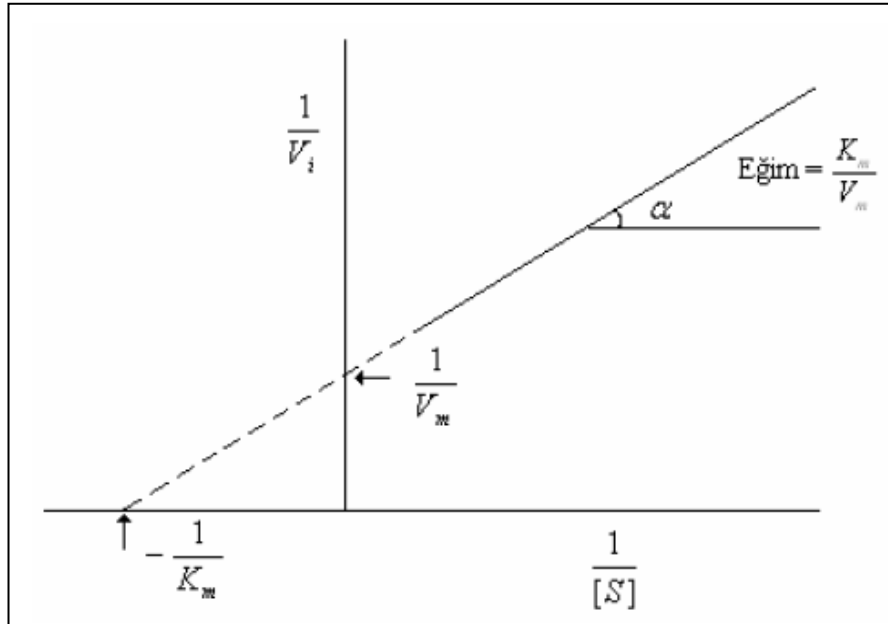
Maksimum hızın yansına ( $V_{\max}/2$ ) karşılık gelen substrat derişimi  $K_m$  (Michaelis-Menten sabiti) olarak belirtilir.  $V_{\max}$  ve  $K_m$  bir enzimin aktivitesini belirleyen önemli enzim sabitleridir.

Michaelis-Menten grafiği 3 bölgeden oluşmaktadır. Birinci bölgede substrat konsantrasyonu düşük olacağından ( $[S] \ll K_m$ ) grafik doğrusaldır. İkinci bölgede oldukça büyük substrat konsantrasyonlarında herhangi bir ihmal yapılamaz, reaksiyon karışık dereceden yürür. Üçüncü bölgede  $[S] \gg K_m$  'dir.  $V = V_{\max}$  olur ve reaksiyon sabit bir hızla devam eder.

Michaelis-Menten grafiği ile bir hiperbol elde edildiğinden, uygulamalarda kolaylık sağlamak amacı ile bunun bir doğru denklemi haline getirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla eksen olęekleri uygun şekilde değiştirilerek, değişik yollardan doğru denklemine dđnüşürülebilir. Bunlardan en çok kullanılanı 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 ordinatta  $1/V_{\max}$ , apsiste  $1/[S]$  değerleri olmak üzere bir doğru elde edilir. Bu doğrunun eğimi ise  $K_m/V_{\max}$  tır (şekil 1.2).



şekil 1.5. Lineweaver-Burk grafiği.

### 1.2.1. Enzim İnhibisyonu

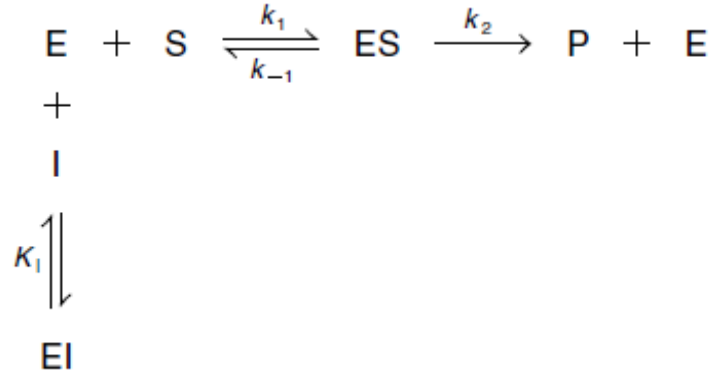
Enzimlerin hem “*in vivo*” hem de “*in vitro*” aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından azaltılması hatta yok edilmesi olayına “inhibisyon” adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere “inhibitör” denilir. İnhibitörler genellikle küçük molekül kütlesine sahip bileşikler veya iyonlardır. Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde baslı basına 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, 2010).

Enzimatik inhibisyon, dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere başlıca iki şekilde sınıflandırılır.

Dönüşümsüz inhibisyonda enzimin bir veya daha fazla fonksiyonel grubu etkilenir. İnhibitör, enzime ya kovalent olarak bağlanır veya kompleks oluşturur.  $V_{max}$  azalırken,  $K_m$  değişmeden kalır.

Dönüşümsüz inhibisyonun aksine dönüşümlü inhibisyonda enzim ile inhibitör etkileşmesi, bir denge reaksiyonu şeklindedir. Dönüşümlü inhibisyon üç grupta incelenir. Bunlar: yarışmalı (kompetitif) inhibisyon, yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyon ve yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyondur.

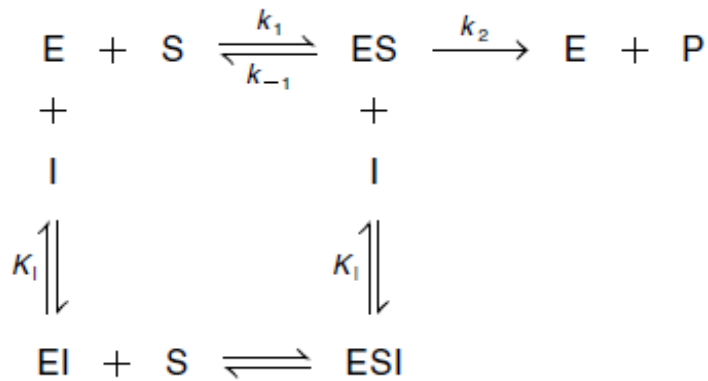
Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi yarışmalı inhibisyondur. Yarışmalı inhibitör yapı itibarıyla substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylece substratın enzime bağlanması önlenmiş olur. Fakat substrat konsantrasyonu artırılmakla inhibisyon etkisi ortadan kaldırılabilir. Yani enzimin  $V_{max}$  değeri değişmezken,  $K_m$  değeri artar.



**Şekil 1.6.** Yarışmalı inhibisyon şematik şekli

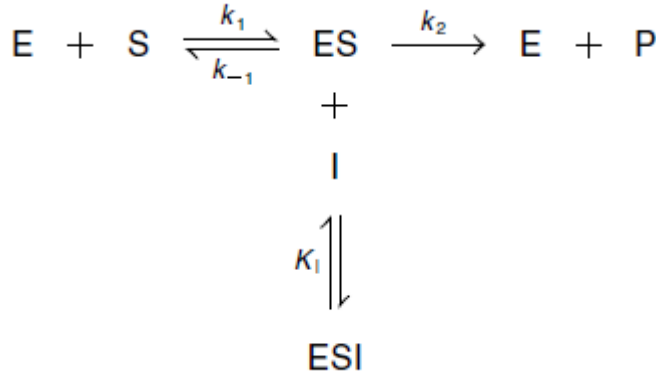
Yine dönüşümlü tip olan yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonda inhibitör ve substrat enzim molekülüne aynı anda bağlanabilir. Bu durum bağlanmanın enzimin aynı bölgesine olmadığını gösterir. Yarışmasız bir inhibitör, etkisini; bir enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek gösterir. Burada substrat ve inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir.

Substrat konsantrasyonu artırılmakla inhibisyon ortadan kaldırılamaz. Enzimin  $V_{\max}$  değeri azalırken,  $K_m$  sabit kalır. Substrat ve inhibitör, farklı bölgelere bağlanabildiğinden enzimin iki çeşit inaktif kompleksi meydana gelir.



**Şekil 1.7.** Yarışmasız inhibisyon şematik şekli

Bir başka dönüşümlü inhibisyon tipi de yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyonudur. Bu inhibisyon çeşidinde inhibitör serbest enzime bağlanamaz. Sadece enzim-substrat (ES) kompleksine bağlanır. Tek substratlı sistemlerde yarı yarışmalı inhibisyona nadir rastlanır. Daha çok birden fazla substratlı enzimler için geçerlidir. Enzim-substrat-inhibitör (ESI) kompleksi ortamda bulunacağından yarı yarışmalı inhibitörün varlığında  $V_{max}$  azalır. ESI kompleksinin oluşumu vasıtasıyla S kompleksi ortamdaki sürekli çekileceğinden enzim ve substrattan ES kompleksinin oluşumu dengesini daha fazla sağa kaydırır ve  $K_m$  değeri küçülür.



**Şekil 1.8.** Yarı yarışmalı inhibisyon şematik şekli

Yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonunun özel bir çeşidi olan lineer karışık tip inhibisyon dönüşümlü inhibisyon çeşitleri arasındadır. Bu tür inhibisyonda enzim, substrat ve inhibitörün bağlanma denge sabitleri farklılaşmaktadır. Birçok multienzim sistemi net reaksiyon hızlarını kendileri düzenleme kapasitesine sahiptir. Bu sistemlerin çoğunda seri reaksiyonların son ürünü belirli bir konsantrasyona eriştiğinde sistemin ilk enzimini veya dallanma noktasındaki enzimi inhibe eder. Bu enzimlere “allosterik enzimler” denir ve bu olaya da “feed-back” inhibisyonu adı verilir. Birden fazla polipeptit zinciri ihtiva eden allosterik enzimlerde inhibitörlerin enzime bağlanmasıyla değişik alt birimlerin bağlanma merkezleri arasındaki etkileşimlerle allosterik inhibisyon olayı meydana gelir. Allosterik enzimleri etkileyen bileşiklere “modülatör” denir.

İnhibisyon çeşidinin ve  $K_i$  sabitinin belirlenmesi için en çok kullanılan yöntem, Lineweaver–Burk grafikleridir. Bu yöntemde  $1/V-1/S$  grafikleri sabit inhibitör ve beş farklı substrat konsantrasyonunda çizilerek  $K_i$  sabitleri hesaplanır.  $K_i$  sabitlerinin bulunmasında ikinci yol Dixon grafikleri yoludur. Bu yöntemde en az iki basit substrat konsantrasyonunda  $1/V-[I]$  grafiği çizilerek kesim noktalarından  $K_i$  sabitleri hesaplanır (Lehninger, 2011; Keha ve Küfrevioğlu, 2010).

### 1.3. Afinite kromatografisi

Afinite kromatografisi bir çeşit adsorpsiyon kromatografisi olup, saflaştırılması istenen molekülün, matriks adı verilen bir katı destek materyaline kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir (Keha ve Küfrevioğlu, 2010). Bir biyolojik ligand veya onun sentetik bir analogu ile saflaştırılmak istenen molekül üzerindeki komplementer bağlama bölgesi arasındaki spesifik etkileşimi esas alan, güçlü bir protein saflaştırma yöntemidir (Bollog *et al.*, 1996). Kullanılacak ligandın saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir bağlanma afinitesi olmalıdır. Ligand olarak substrat, hormon, koenzim, kofaktör, antikor, aminoasitler, oligopeptid, oligonükleik asit ve nükleik asitlerin de (DNA, RNA) bulunduğu çok sayıda biyofonksiyonel molekül kullanılabilir (Denizli ve Pişkin, 1995).

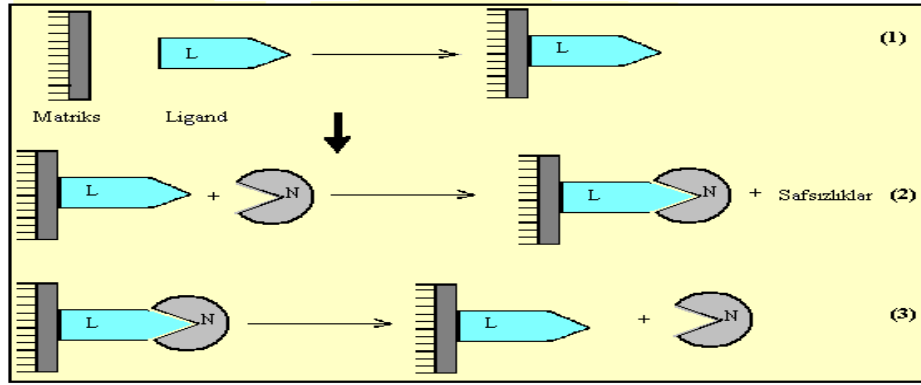
Bu yöntem sayesinde çok yorucu, zor ve bazı hallerde imkânsız olan birçok ayırma ve saflaştırma işlemi kısa zamanda gerçekleştirilebilir ve yüksek verimde binlerce kez saflaştırılmış bileşikler elde edilebilir (Arslan 1994). Afinite kromatografisi ilk defa 1910 yılında amilazın çözünmeyen nişastaya adsorpsiyonu sonucu izolasyonunda kullanılmıştır, fakat kovalent olarak ligandların bağlanabileceği dayanıklı matrikslerin bulunmayışından, bu teknigin yaygın halde uygulanması 1967 den sonra gerçekleşebilmiştir. Bu tarihte, primer amino grubuna sahip bileşiklerin siyano bromür (CNBr) ile aktifleştirilmiş polisakkarit matriks üzerine kovalent bağlanabileceği gösterilmiştir (Arslan, 1994).

Ayrıca literatür de, afinite jelleri için kullanılan matrikslerin aktivasyonu için, oksiran aktifleştirilmesi, karbodiimid aktifleştirilmesi gibi değişik aktifleştirilme yöntemleri de kullanılmıştır(Arslan, 1994). Bu keşiften sonra afinite kromatografisinden yararlanarak, biyospesifik ligandlarla antikolar, bazı taşıyıcı proteinler, enzimler, nükleik asitler ve hatta bir takım hücrelerde çok saf halde elde edilmeye başlanmıştır (Arslan, 1994).

Literatürde afinite jelleri için kullanılan matrikslerin aktivasyonu için, CNBr aktifleştirilmesi dışında, oksiran ve karbodiimid aktifleştirilmesi gibi değişik aktifleştirme yöntemleri de bulunmaktadır(Arslan, 1994). Afinite kromatografisinin yaygınlaşmasından sonra, yöntemin avantajlarından ve modifikasyonlara açık olmasından yararlanılarak, biyospesifik ligandlarla antikolar, enzimler, bazı taşıyıcı proteinler, nükleik asitler ve çok saf halde elde edilmeye başlanmıştır. Karbonik anhidrazın afinite kromatografisi ile ilk defa 1972 yılında Falkbring ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 1974 yılında Whitney'in, 1975 yılında Wistrand ve arkadaşlarının, 1976 yılında Johansen, 1992 yılında Özdemir'in,1994 yılında Arslan'ın, 1995 yılında Çelik'in, 1997 yılında Tozlu'nun çalışmaları görülmektedir (Arslan,1994; Çelik, 1995; Falkbring *et al.*, 1972; Johansen, 1976; Özdemir, 1992; Tozlu, 1997; Whitney,1974).

Afinite kromatografisinde, katı destek materyaline "ligand" adı verilen özel bir molekül immobilize edilir. Bu molekül saflaştırılmak istenen materyale karşı spesifik bir biyolojik ilgi duyarak onu belirli bir kuvvette dönüşümlü bir şekilde bağlamalıdır (Arslan, 2003).





**Şekil 1.9.** Afinite kromatografisinin prensibi

**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

### 1.3.1. Matriks

Afinite kromatografisinde matriks olarak Sephadex, Sepharose, Bio-jel gibi farklı jeller kullanılmaktadır. Bunlar içinde en çok kullanılan Sepharose, inci şeklinde dizilmiş bir agaroz jelidir. Bu jel, biyolojik aktif moleküllerin immobilizasyonda başarılı bir matriks için gerekli olan bütün özelliklere sahiptir

Şeker kalıntıları üzerindeki hidroksil grupları, bir ligandın kovalent bağlanması için kolayca derivatize edilebilir. Bunlardan Sepharose 4B en iyisidir ve en çok kullanılanıdır.

Jel filtrasyon kromatografisindeki dışarılama limiti, (molekül kütlesi olarak)  $2 \cdot 10^7$  olan Sepharose 4B'nin açık porlu yapısı, iç tarafını ligand bağlanmasına uygun hale getirir ve büyük moleküller için bile, iyi bir bağlanma kapasitesi temin eder. Söz konusu jel, oldukça yüksek spesifik adsorbsiyon gösterir; bunun böyle olması, afinite kromatografisinin gücünün spesifik etkileşmelere bağlı olmasından dolayı zorunludur. Jelin inci yapısı, mükemmel akış özellikleri ve partiküller arasında minimum kanallama sağlar; böylece hızlı ayırma mümkün olur (Keha ve Küfrevioğlu, 2010).

### 1.3.2. Ligand

Afinite kromatografisi için ligand seçimi iki faktör tarafından etkilenir. Birincisi, ligand saflaştırılacak madde için spesifik ve tersinir bağlama afinitesi göstermelidir. İkincisi, ligandın bağlama aktivitesini tahrip etmeden matrikse tutunmasını sağlayan kimyasal olarak modifiye edilebilen grupları olmalıdır. Ligandın maddeyi bağlama afinitesinin serbest çözültide  $10^{-4}$ - $10^{-8}$  M arasında olması idealdir.  $10^{-4}$  M'dan daha büyük ayrışma sabitlerini içine alan etkileşmeler (bir enzim ve zayıf bir inhibitörü arasındaki ilgi gibi), başarılı afinite kromatografisi için uygun değildir.  $10^{-8}$  M'dan daha küçük ayrışma sabitlerine sahip olan maddeler (bir hormon ve reseptörü arasındaki etkileşme gibi)'den meydana gelen afinite kromatografisinde ise, bağlı maddelerin inaktive edilmeden elüsyonu zor olacaktır.

Ligandın matrikse bağlandığı bölgenin seçimi önemlidir. Ligand çeşitli fonksiyonel gruplara sahipse, saflaştırılacak moleküle en az ihtimalle spesifik etkileşme verecek grup vasıtasıyla matrikse bağlanmalıdır (Lehninger, 2011).

### 1.3.3. Uzantı Kolu

Biyolojik bir maddenin aktif bölgesi, genellikle molekülün derinliklerine yerleşmiştir. Küçük ligandları doğrudan matrikse bağlamak suretiyle hazırlanan adsorbanlar, matriks ile liganda bağlanan maddeler arasında sterik engellemelerden dolayı küçük ayırma kapasitesi gösterebilirler. Bu durumlarda uzantı kolları, etkili bağlamayı kolaylaştırmak için matriksle ligand arasına sokulurlar.

Uzantı kolunun uzunluğu önemlidir. Şayet çok kısa ise, kol etkisiz olur ve ligand numunedeki maddeyi bağlayamaz. Aksine çok uzunsa, spesifik olmayan etkiler fazla olur ve ayırmanın seçiciliği azalır ( O'carra *et al.*, 1973 )

### 1.3.4. Ligandı Bağlayacak Jelin Seçimi

Ligandı bağlayacak jelin uygun şekilde seçimi için, ligand molekülünde bulunan bağlanma gruplarının tipi ve saflaştırılacak madde ile bağlanma reaksiyonunun tabiatına dikkat edilir ve ona göre karar verilir. Ligandın matrikse kovalent bağlanması, normal bağlanma reaksiyonunu minimum engellemek amacıyla, molekülün en az etkili bölgesine yapılmalıdır. Örneğin, amino grupları ihtiva eden bir enzim inhibitörü, matrikse amino grupları vasıtasıyla bağlanabilir; bu suretle inhibitörün enzimle spesifik bağlanma aktivitesi korunmuş olur. Bununla birlikte amino grupları da bağlanma reaksiyonuna girerlerse, bu durumda zorunlu olmayan başka bir grupta bağlamak gerekecektir. Ligandlardaki bağlanma bölgelerinin yeri hakkında önceden bilgi bulunmadığı durumlarda, deneme-yanılma yöntemi kullanılmalıdır.

Ligandı immobilize etmek için çoğunlukla kullanılan gruplar, Tablo 12.1.4.1.'de verilmiştir. Bu grupların her biri tarafından ligandların bağlanabileceği jeller de karşılarında gösterilmiştir (Lehninger, 2011).

**Tablo 1.2.** Ligandları immobilize etmek için kullanılan gruplar ve bağlandıkları jeller.

<i>Ligand</i>	<i>Fonksiyonel Grup</i>	<i>Bağlanacak Jel</i>
Protein, peptid, aminoasit	Amino	CNBr ile aktifleştirilmiş Sepharose 4B
		CH- Sepharose 4B
		Aktifleştirilmiş CH-Sepharose 4B
		Epoksi aktifleştirilmiş Sepharose 6B
	Karboksil	AH-Sepharose 4B
	Tiyol	Tiyopropil- Sepharose 6B
		Aktifleştirilmiş tiyol sepharose
Epoksi aktif.- Sepharose 6B		
Şeker	Hidroksil	Epoksi aktif.- Sepharose 6B
	Amino	CH- Sepharose 4B
		Aktif.CH- Sepharose 4B
		Epoksi aktifleştirilmiş Sepharose 6B
Karboksil	AH- Sepharose 4B	
Polinükleotit	Amino	CNBr ile aktif. Sepharose 4B
		Tiyopropil- Sepharose 6B
Koenzim, kofaktör, antibiyotik, steroid vs.	Amino, karboksil, tiyol veya hidroksil	Uzantı kollu jel kullanarak

### **1.3.5. Afinite Kromatografisi Türleri**

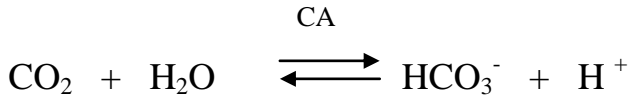
Biyoafinite Kromatografisinin alt başlıkları (Janson ve Ryden, 1997).

1. Hidrofobik Kromatografi
2. İmmünoafinite Kromatografisi
3. Kovalent Afinite Kromatografi
4. Metal-Şelat Afinite Kromatografi
5. Moleküler Baskılama Afinite Kromatografi
6. Membran-Bazlı Afinite Kromatografi
7. Afinite Kuyruk Kromatografi
8. Lektin Afinite Kromatografisi
9. Boya-Ligand Afinite Kromatografi
10. Reseptör Afinitesi
11. Zayıf Etkileşim Afinite Kromatografi
12. Perfizyon Afinite Kromatografi
13. Tiyofilik Kromatografi
14. Yüksek Performans Afinite Kromatografi
15. Afinite Yoğunluk Pertörbasyon
16. Kütüphane Türevli Afinite
17. Afinite Elektrofrezisi
18. Afinite Kapiler Elektrofrezisi
19. Santrifüj Afinite Kromatografi

## 1.4. Karbonik Anhidraz

### 1.4.1. Fizyolojik Fonksiyonları

Karbonik anhidraz bütün organizmalarda yaygın olarak bulunan ve aktif bölgesinde  $Zn^{+2}$  iyonu içeren bir metaloenzimdir (karbonat hidrolizaz E.C.4.2.1.1). prokaryot ve ökaryotlarda bulunup, dağılımı geniş ve birbirinden bağımsız dört gen ailesi tarafından kodlanmış olan bir metaloenzimlerdir. İlk defa sığır eritrositlerinde keşfedilen karbonik anhidraz (CA), canlılarda  $CO_2$ 'nin hidratasyonu ve  $HCO_3^-$ 'in dehidratasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen önemli bir enzimdir (Supuran, 2011).



CA ilk olarak memeli eritrositlerinden izole edilmiştir, daha sonraki yıllarda enzim, insan eritrositleri, balık eritrositleri, sıçan eritrositleri, sıçan tükrüğü, sığır kemiği, sığır lökositleri, sığır kemik iliği çeşitli bakteriler ve bitki kaynaklarından saflaştırılmış ve birçok kaynaktan karakterize edilmiştir. Son olarak Enzimin memelilerdeki molekül kütlesi 30.000 Da civarında olduğu tespit edilmiştir (Beydemir *et al.*, 2002; Beydemir ve Gülçin, 2004; Feldstein ve Silverman, 1984; Krungkrai *et al.*, 2001).

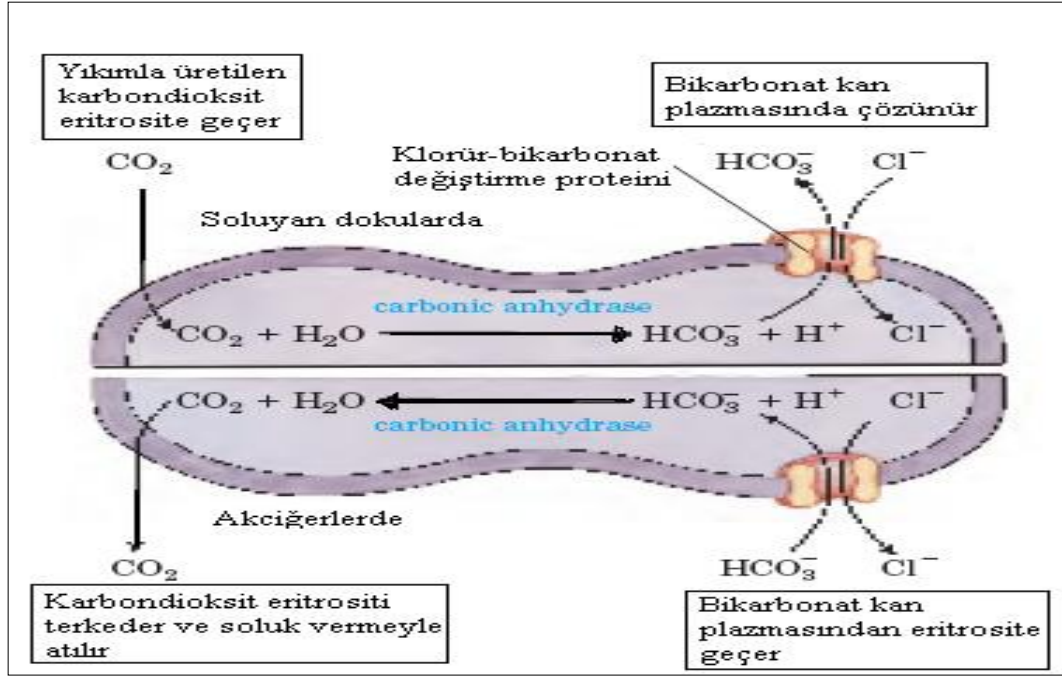
Balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında ve alglerde, enzimin değişik rolleri olduğu ayrıca ispatlanmıştır (Supuran ve Scozzafava, 2001; Wistrand, 1981; Holmes, 1977; Chegwiddden *et al.*, 2000).

Bu reaksiyon ve ürünleri ile metabolizmada, asit-baz dengesinin sağlanması, CO<sub>2</sub>'nin taşınması, elektrolit sekresyonu, ürejeniz, lipogenez ve glukoneogenez gibi biyosentetik reaksiyonlarda, kemik resorpsiyonu, kalsifikasyon, tümör oluşumu ve daha bir çok fizyolojik ve patolojik proseslerde görev almaktadır (Sly, 1995). Karbonik anhidraz yukarıdaki reaksiyonun dışında karboksilik, sülfonik, karbonik ve fosforik esterlerin, aldehitlerin ve piruvatın hidrolizini de katalizler. Ancak, bunların fizyolojik önemi bugüne kadar gösterilememiştir (Lindskog, 1997).

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 aldehitlerin 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<sub>2</sub> / bikarbonatın respirasyonu ve transportu ile ilgili kritik fizyolojik olaylarda, pH ve CO<sub>2</sub> 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).

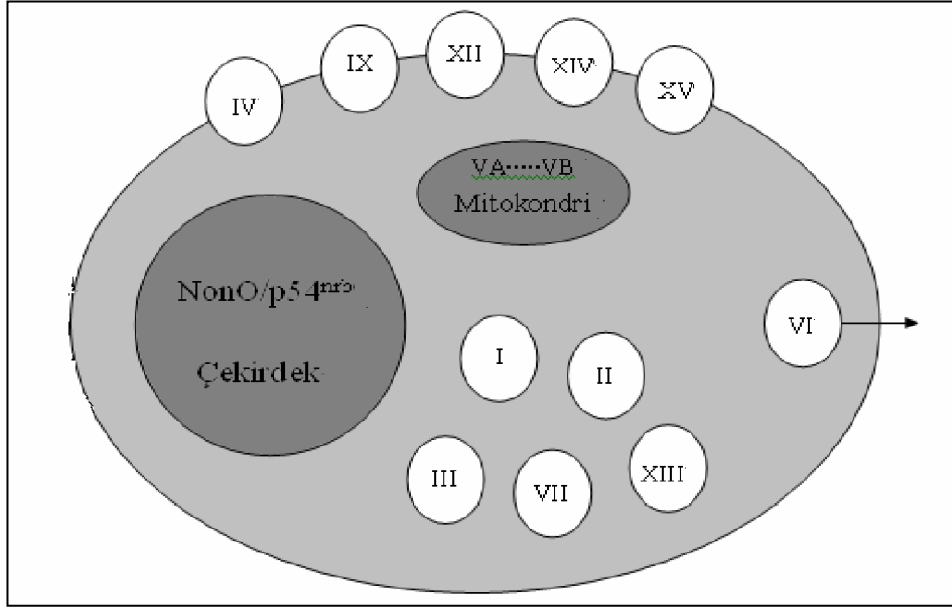


**Şekil 1.10.** Eritrosit membranının klorür-bikarbonat değiştiricisi. Bu kotransport sistemi, transmembran elektriksel potansiyelde herhangi bir değişiklik yapmadan  $\text{HCO}_3^-$ 'ın giriş ve çıkışını sağlar. Görevi kanın  $\text{CO}_2$  taşıma kapasitesini artırmaktır (Lehninger, 2005).

#### 1.4.2. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri

Aynı canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ancak farklı kimyasal ve fiziksel özellikleri olan enzimlere izoenzim veya izozim denir. İzoenzimlerin substratlarına, kofaktrlerine ve inhibitörlerine karşı ilgileri farklıdır. İzoenzimlerin başlıca özellikleri arasında amino asit sayı 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 (Devlin, 2002).





**Şekil 1.11.** Bazı CA izoenzimleri içinde katalitik olarak aktif CA izozimlerinin sematik olarak hücredeki yerlesimleri[Aydoğan, 2006]

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 nonkataliktir (VIII, X, XI) (Supuran *et al.*, 2003; Supuran *et al.*, 2004). 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 (Nishimori, 2004; Hilvo *et al.*, 2005).

İnsanda farklı izoenzimlerin gen yapısı belirlenmiş ve bu izoenzimlerin hayati fonksiyonlarının doku ve organlara göre farklılık gösterdiği bulunmuştur. Bu dokular arasında; akciğer, böbrek, gastrik mukoza, göz lensi, tükürük bezleri, kaslar, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokular başta gelmektedir ve bunların çoğundan CA enzimi karakterize edilmiş ve fonksiyonları belirlenmeye çalışılmıştır (Hewett ve Emmett, 2000; Sugrue, 2000).

Genelde insanda bulunan CA izoenzimlerinin incelenmesi sonucu izoenzimler ortaya çıkarılmıştır. CA-I, insan eritrosit hücrelerinde bulunan bir izoenzimdir ve insan kanından saflaştırıldığında, miktarı 12 mg/g hemoglobin olarak hesaplanmıştır. Eritrositlerde CA-I izoenzimi yanında CA-II izoenzimi de bulunmaktadır. Bu izoenzimlerin en önemli fonksiyonları ise, doku kılcal damarlarından metabolizma ürünü olan CO<sub>2</sub>'i, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>'a, akciğer pulmoner kapilerde ise HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>'in CO<sub>2</sub>'e dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyerek solunum olayında yer almasıdır (Şekil 1.2). CA-I izoenziminin turnover sayısı 2,5 x 10<sup>5</sup> s<sup>-1</sup> 'dir. Bu izoenzimin fizyolojik fonksiyonu CA-II kadar açık değildir. CA-I eksikliği sendromu belirlenmiş fakat herhangi bir klinik semptomla ilgisi bulunamamıştır (Ren ve Lindskog, 1992; Sly ve Hu, 1995; Supuran ve Scozzafava, 2001).

CA-II izoenzimi karbonik anhidrazın en çok çalışılan formudur. Bu izoenzimin turnover sayısı 25°C'de 10<sup>6</sup> s<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur. İnsan eritrosit hücrelerinden saflaştırılan CA-II izoenzimi miktarı 2 mg/g hemoglobin olarak hesaplanmıştır ve bu değer CA-I'e kıyasla daha azdır.

Göz lensi, kornea ve silyer epitelyumda ise, CA-II ve CA-IV izoenzimleri bol miktarda bulunmaktadır. Bu dokuda bulunan CA-II izoenziminin önemi, glaucoma hastalığı tedavisi için yapılan araştırmalar sonucu ortaya çıkarılmıştır. (Renzi *et al.*, 2000). Böbrek korteksinde ise membrana yapışık halde olan CA-II izoenzimi ile Na<sup>+</sup> ve H<sub>2</sub>O'nun geri emilimi sağlanmaktadır. CA-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 CA-II izoenziminin kemik, böbrek ve beyin dokuları için ne derece önemli olduğunu ortaya koymaktadır (Maren *et al.*, 1997).

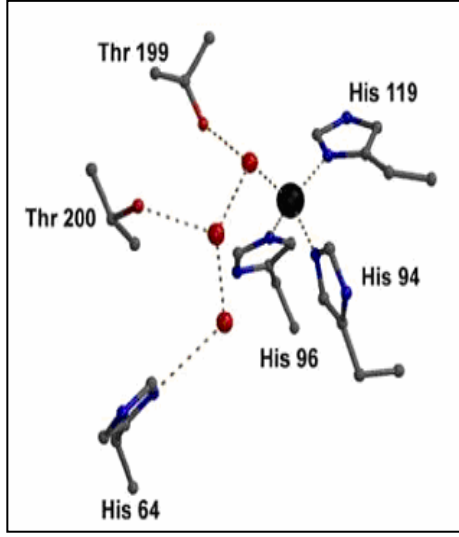
**Tablo 1.3.** Karbonik anhidraz izoenzimleri (Lindskog 1997).

<b>İZOENZİM</b>	<b>KATALİTİK AKTİVİTE</b>	<b>BULUNDUĞU BÖLGE</b>
CA I	Düşük	Sitozol
CA II	Yüksek	Sitozol
CA III	Çok düşük	Sitozol
CA IV	Yüksek	Membrana bağlı
CA V	Orta-yüksek	Mitokondri
CA VI	Orta	Tükürükte gizli
CA VII	Yüksek	Sitozol
CA-RP VIII	Akatalitik	Muhtamelen sitozolik
CA IX	Yüksek	Membrana bağlı
CA-RP X	Akatalitik	Bilinmiyor
CA-RP XI	Akatalitik	Membrana bağlı
CA XII	Düşük	Membrana bağlı
CA XIII	Muhtemelen yüksek	Bilinmiyor
CA XIV	Düşük	Membrana bağlı

### 1.4.3. Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Üç Boyutlu Yapıları

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin üç boyutlu yapılarında büyük farklılıklar gözlenmektedir. izoenzimlerinin üç boyutlu yapılarındaki farkın çok belirgin olmasına karşın, aktif bölgelerindeki katalitik grupların hemen hemen aynı olması dikkat çekicidir. Şekil 1.12’de gösterildiği gibi, her bir izoenzimin aktif bölgesi, yaklaşık tetrahedral geometriye sahip, üç histidin imidazol halkası ve bir su molekülü koordine olmuştur.  $Zn^{+2}$  iyonun kataliz olayındaki fonksiyonu vazgeçilmez olup, uzaklaştırılmasıyla elde edilen apo-CA enzimleri, tam anlamıyla aktiviteden yoksundurlar(Lindskog, 1997; Mohanty ve Kannan, 1998; Lindskog ve Coleman, 1973; Lowe *et al.*, 1991).

Karbonik anhidrazın sözü edilen üç izoenzimi, yapıları yönünden çok benzemesine rağmen, aktiviteleri açısından farklılık göstermektedir. CA-II izoenzimi CA-I izoenziminden 60 ile 100 kat daha fazla aktif olup, bilinen enzimler arasında katalitik aktivitesi en yüksek olanıdır. CA-III ise, en az aktif olan izoenzimdir ve  $CO_2$ -hidrataz aktivitesi CA-I izoenziminin %5 kadardır (Wistrand, 1980; Ryon *et al.*, 1982).



**Şekil 1.12.** Karbonik anhidraz izoenzimlerinin katalitik bölgeleri (His 94, His 96, His 119) (Büyük küre  $Zn^{+2}$  iyonunu, etrafındaki küçük küreler de kristal yapıda immobilize olmuş su moleküllerini belirtmektedir.)( Lindskog, 1997).

$\alpha$ -CA,  $\beta$ -CA ve  $\gamma$ -CA olarak adlandırılan, evrimsel açıdan ilişkisiz üç farklı familyada varlığı tespit edilen CA'lar, şaşırtıcı yeni buluşlardan biridir (Hewett *et al.*, 1996). Farklı familyalarla gösterilen homolog enzimler arasında önemli bir fark yoktur, aksine onların hepsinde çinko iyonu vardır. Bundan dolayı bu familyaların hepsi, katalitik fonksiyonu yerine getirmeleri yönünden birbirine benzer yapıdalardır (Hewett ve Emmett, 2000).

#### 1.4.3.1. $\alpha$ -Karbonik anhidrazlar

İnsan CA-I ve CA-II izoenziminin kristal yapısı ile sığır CA-III, yassı formu bir sığan CA-V'i ve E. coli'de bulunan CA formu bu yapıdaki enzim tipidir. Bu izoenzim formlarının genel yapıları çok benzerdir. Moleküller neredeyse küresel, yaklaşık boyutları ise  $5 \times 4 \times 4 \text{ nm}^3$ 'tür. Molekülün kalan kısmına gevşek şekilde bağlı olan amino terminal bölge haricinde (yaklaşık 24 aminoasit), bu  $\alpha$ -CA'lar tek etki alanlı proteinler olarak düşünülebilir (Lesburg ve Christianson, 1995).

Molekülün geri kalan kısmına zayıfça bağlanan amino terminal bölgesinin dışında,  $\alpha$ -CA bir bölge proteini olarak düşünülebilir. Yapının ikinci bölgesi on iplikçik ve molekülü iki eşit parçaya bölen sarılmış bir  $\beta$  şeridinden oluşmuştur. Paralel iplikçiklerin iki parçası dışında, diğer  $\beta$  şeritleri antiparalel olarak uzanmışlardır. Diğerlerine nispetle daha kısa olan heliksler, molekülün yüzeyine yerleşmişlerdir (Boriack-Sjodin *et al.*, 1995).

Aktivite bölgesi, neredeyse molekülün merkezine uzanan büyük, koni biçimli bir oyukta bulunur. Çinko iyonu bu oyukun tabanına yakındır. Dördüncü ligandın  $H_2O$  veya  $OH^-$  olduğu tetrahedral geometrideki His-94, His-96 ve His-119'dan üç azot atomuna bağlıdır. Ligandlar proteindeki diğer gruplara hidrojen bağlarıyla tutunmuş ve bir "dolaylı ligand" kabuğu oluşturmuştur (Lesburg ve Christianson, 1995).

Metal iyonlu ligandlar ve dolaylı ligandların  $\alpha$ -CA amino asit dizilişleri sabittir. Doğrudan ve dolaylı çinko ligandlarına ek olarak, sıralı bütün  $\alpha$ -CA'larda 17 aminoasit rezidüsü kesin şekilde korunur. Bu rezidülerden bazıları katalitik aktivite açısından önem taşıırken, diğerleri protein yapısının kararlılığında rol oynar. Esasen bilinen, bütün  $\alpha$ -CA ailesi ve  $\alpha$ -CA ile ilişkili proteinler içinde, sadece 10 aminoasit rezidüsü tamamen sabittir. Bu rezidülerden bazılarının insan CA II'nin kararlılığı açısından önemi, bölgeye özel mutajenez ile test edilmiştir.

#### 1.4.3.2. $\beta$ -Karbonik anhidrazlar

Henüz hiçbir  $\beta$ -CA yapısı belirlenmemiştir. Doğal ve mutant bezelye kloroplast CA'sı çapraz bağ çalışmaları, enzimin belirlenen bir alt birimin oktamer yapısında olduğunu kuvvetle savunur. Mutasyonlar ve X-ray spektroskopisi absorpsiyon sonuçları; ıspanaktaki Zn (II) iyonu,  $\alpha$ -CA'dakinin aksine bir Cys-His-Cys- $H_2O$  grubuyla koordine olmuş bir küre şeklinde olduğunu göstermektedir (Björkbacka *et al.*, 1997).

### 1.4.3.3. $\gamma$ -Karbonik anhidrazlar

Son araştırmalarda *M. thermophila*'dan elde edilen bir yapı olarak  $\gamma$ -CA'nın yapısı ortaya konmuştur. Bu trimetrik molekül  $\alpha$ -CA'lardan tamamen farklı katlanmalara sahip olup ve bu bölge kalıtsal bölgeyi vurgulamaktadır. Her bir ünite, her dönüş başına üç kısa iplikçik bulunan sol el  $\beta$ -heliks yapısının yedi dönüşü ile olmaktadır. Bunun sonucunda birbirinin yanında üç tane yassı  $\beta$ -şeridi meydana gelir. Heliksin karşılıklı bölmeleri de üçgen yapısındadır.

Çinko iyonları ise alt üniteler arasında bulunur ve bir alt üniteden His-81 ve His-122'ye ve bitişik bir alt birimden His-117 ile ligand oluşturmuştur. Varsayılan bir su molekülü bükülmeyi sağlayarak, tetrahedral yapının oluşumunu tamamlar. *M. thermophila* CA'sındaki ve insan CA-II'deki metal merkezli bu pozisyon önemli benzerlikler gösterir ve bu durumda katalitik fonksiyonların yakın olması da çinko bağılı bölgelerin benzer olmasından ileri gelmektedir (Kisker *et al.*, 1996).

### 1.4.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar

Karbonik anhidraz CO<sub>2</sub> molekülünün hidratasyonu reaksiyonunun yanısıra, siyanatın karbamik aside veya ürenin siyanamide, aldehidin geminal diol hidratasyonu reaksiyonlarını da katalizlemektedir. Karboksilik, sulfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizleri de bu enzim tarafından katalizlenmektedir. Ancak CA enziminin hidrataz aktivitesi dışında aşağıdaki tablodan da görüldüğü üzere elektrofilik bir merkeze, nükleofilik atakları içeren, aldehit, pirüvat ve alkil pirüvatların hidratasyonu, pirüvik sülfonik ve fosforik esterlerinin hidrolizi gibi reaksiyonlarını da katalizlediği bilinmektedir. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesini ortaya koyan bu özelliği ile organizmada fizyolojik bir rolü olup olmadığı henüz bilinmemektedir (Kaiser, 1969; Jabusch, 1989).

**Tablo 1.4.** Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri (Özensoy, 2002)

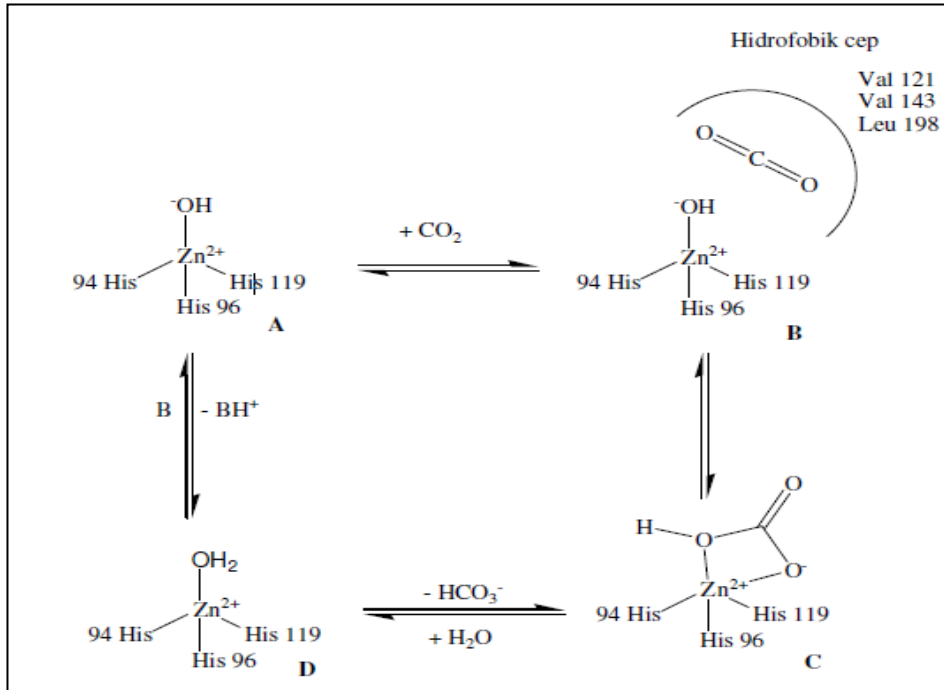
(1)	$O=C=O + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$
(2)	$O=C=NH + H_2O \rightleftharpoons H_2NCOOH$
(3)	$HN=C=NH + H_2O \rightleftharpoons H_2NCONH_2$
(4)	$RCHO + H_2O \rightleftharpoons RCH(OH)_2$
(5)	$RCOOAr + H_2O \rightleftharpoons RCOOH + ArOH$
(6)	$RSO_3Ar + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + ArOH$
(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)

#### 1.4.5. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması

Son 20 yıldır CA enzimini katalitik mekanizmasını aydınlatmayı amaçlayan çalışmalar yapılmıştır (Lindskog ve Silverman, 2000). Bu çalışmalarla elde edilen sonuçlara göre, CA enziminin, çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesini kaybetmeden uzun süre saklanabilmesi gibi avantajlı özelliklere sahip olduğu anlaşılmıştır. Aktif bölgede  $Zn^{+2}$  iyonu ve ona bağlı bir hidroksil grubu ihtiva etmektedir. Aktif bölge yakınındaki aminoasitler, proton verici ve proton gradienti oluşturacak şekilde düzenlenmiştir (Lindskog and Silverman 2000).

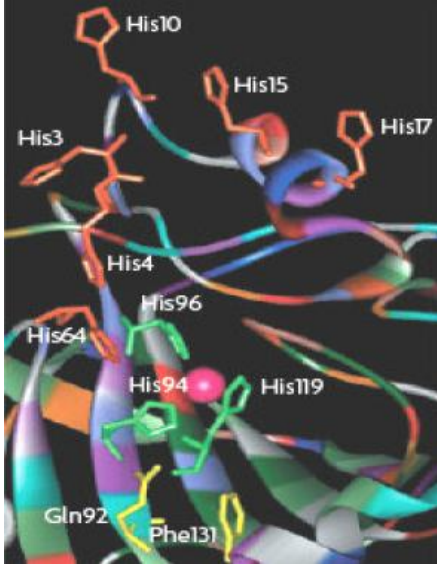
CA enziminin reaksiyonları katalizinde,  $Zn^{+2}$  iyonunun büyük önemi vardır. Yapılan X-ray kristalografi sonuçları, metal iyonunun bir  $H_2O$  veya  $OH^-$  iyonu ve üç histidin rezidüsü (His 94, His 96, His 119) tarafından koordine edilen, aktif bölgedeki  $15 \text{ \AA}$  derinliğindeki bir yarıgın tabanında yer alandığını göstermektedir. Çinko bağlı  $H_2O$ , Glu106'nın karboksilat grubuna sırasıyla köprü oluşturan Thr199'un hidroksil grubuyla, hidrojen bağı etkileşimleri sonucu tutunmaktadır.

Bu etkileşimler, çinko bağlı su molekülünün nükleofilik karakterini arttırmakta ve molekül nükleofilik atak için uygun yerdeki CO<sub>2</sub>' ye doğru hareket etmektedir (Arslan 1994). Zn<sup>+2</sup> iyonuna hidroksil grubunun bağlanmasıyla enzimin aktif formu oluşur (Sekil 1.13-A). Enzimin aktif formu, güçlü nükleofilik yapısıyla CO<sub>2</sub> molekülüne saldırır (Sekil 1.13-B). Bu da, Zn<sup>+2</sup> iyonuna bağlanmış bikarbonat iyonunun oluşmasını sağlar (Sekil 1.13-C). Daha sonra, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> iyonu bir su molekülüyle yer değiştirir ve çözeltiliye geçer. Bunun sonucunda, Zn<sup>+2</sup> iyonuna su molekülü bağlanır ve bu da Şekil 1.13-D 'de görüldüğü gibi enzimin asit formuna dönüşmesini sağlar (Lindskog 1997).



**Şekil 1.13.** CA enziminin CO<sub>2</sub>-hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik gösterilişi (Lindskog, 1997).





**Şekil 1.14.** CAII aktif kısmı. Zn(II) iyonu(merkez) ve 3 histidin ligantı ( His94, His 96, His119) görülmektedir. Anyon değiş-tokuşunun karboksiterminal kısmında gerçekleşmektedir (Scozzafava ve Supuran, 2002).

Katalizdeki hız sınırlaması ikinci reaksiyondur. Enzimin hidroksit kısımlarını rejenere eden proton transferidir (Zimmerman *et al.*, 2007). CAII, CAIV, CAV, CAVII ve CAIX gibi kataliz özellikli çok aktif izoenzimlerde süreç, bir histidin rezidüsü (His64)tarafından, en etkili CA izoenzimi CAII 'ye yönelik oldukça etkili proton transferi sürecini takiben aktif kısmın girişinde konuşlanır.

Bu durum, ayrıca CA II' nin, bilinen en aktif enzim olduğunu açıklar (  $k_{cat} / K_m = 1,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  degeri ile) ve aynı zamanda klinik uygulamaları olan inhibitörlerin dizaynı için önemli sonuçlar veren bir durum olmaktadır (Supuran, 2008).

#### 1.4.6. Karbonik Anhidrazın Önemli İnhibitörleri

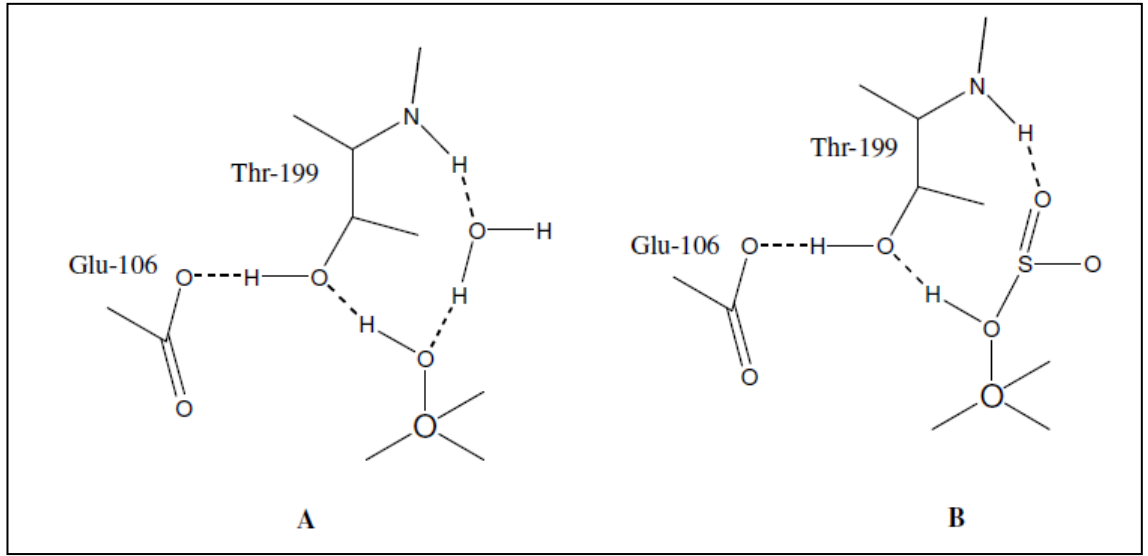
Çogu tek değerli anyon CA enzimini inhibe eder. Fakat bu iyonların konsantrasyonları: (sığır CA-II, pH 7,55'de) birkaç mikromolar seviyesinde inhibisyon gösteren  $\text{CN}^-$  iyonu ve 1 M'lik iyon konsantrasyonunda inhibisyon gösteren  $\text{F}^-$  iyonunda olduğu gibi büyük değişiklik gösterir (Lindskog,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

İnhibisyonun pH bağımlılığına ve  $2 \text{Co}^{+2}$ 'nin yer değiştirdiği enzimin optik spektrum üzerindeki etkilerine ilişkin çalışmalar, anyonik inhibitörlerin metal iyonuna bağılandığı ve katalitik  $\text{CO}_2$  hidrasyonunda önemli bir rolü olan  $\text{OH}^-$  iyonunun oluşumunu önlediği sonucuna varılmıştır.  $2 \text{Co}^{+2}$  ile ilgili spektrumlar bazı anyonların sadece çinko bağılı çözücü molekülü yerinden ederek tetrahedral koordinasyonu sağladığını, diğer anyonlarınsa pentahedral koordinasyon yapısı oluşturduğunu ileri sürmektedir (Lindskog, 1982).

Lund Üniversitesinde Profesör Anders Liljas'ın labarotuarında yapılan insan CA-II çalışmaları başta olmak üzere, son kristalografik çalışmalar, anyonik inhibitörlerin çeşitli bağı biçimlerine yeni bir ışık tutmuştur. Aktif bölgenin önemli bir özelliği çinkoya bağılı  $\text{H}_2\text{O}$  veya  $\text{OH}^-$  iyonu içeren Glu-106 ve Thr-199 bulunduran indirekt liganddaki bir H bağlanma sistemidir.

Glu-106 büyük olasılıkla iyonlaşmıştır ve bu nedenle, hidrojen bağılı Thr-199 ile bir alıcı görevi görmelidir. Sonuç olarak, Thr-199'un hidrosil grubunun, metal bağılı çözücüyle bağlanmasında bir H atomu alıcısı olduğu kabul edilmelidir. Ayrıca, çinkoya bağılı  $\text{H}_2\text{O}$  veya  $\text{OH}^-$ , hidrofobik bir cepte bulunan bir başka su molekülü ile bir hidrojen bağı oluşturur. Hidrojen, Thr-199'un peptit  $\text{NH}$ 'ına bağlanır. Bu hidrojen bağı etkileşimlerinin, inhibitörlerin bağı üzerinde belirleyici etkisi olduğunu göstermektedir (Liljas *et al.*, 1994).

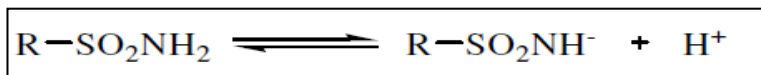
Protonlanmış bir ligand atomuna sahip olan inhibitörler, tetrahedral koordinasyon geometrisini bozmaksızın metale bağlı çözücü molekülün yerini alırlar ve Thr-199'un OH grubu ile hidrojen bağı kururlar.  $\text{HSO}_3^-$  ve  $\text{HS}^-$  iyonları buna örnek olarak verilebilir.  $\text{HSO}_3^-$  iyonu derinde olan su molekülü ile yer değiştirirken bir oksijen atomu Thr-199'un NH gurubu ile hidrojen bağı oluşturur. Üçüncü oksijen atomu 0,31 nm mesafeden çinkoya doğru yönelir (Mangani ve Hakansson, 1992).



**Şekil 1.15.** CA-II ile inhibitörler arasındaki komplekslerin yapılarının sematik çizimleri. (A İnhibe olmayan enzim B Bisülfür)

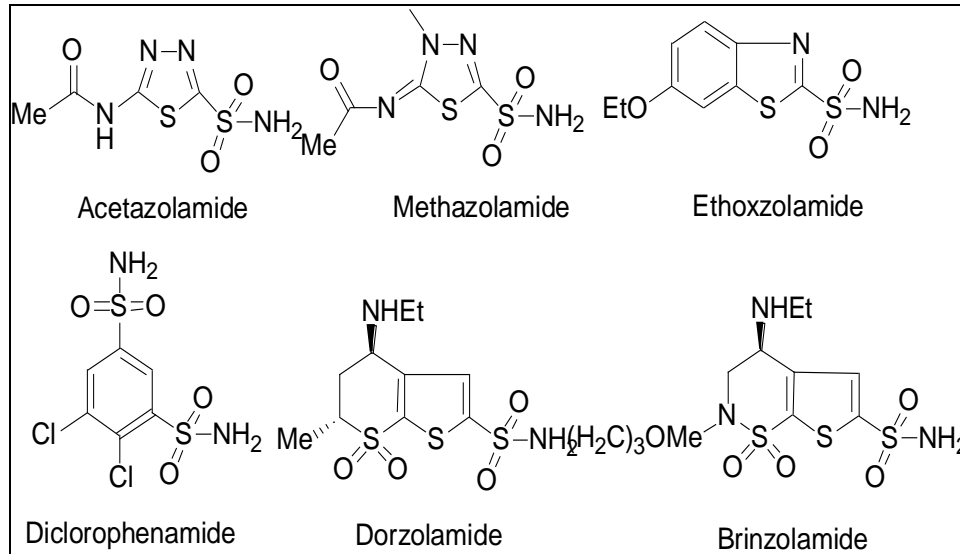
$\text{SO}_4^{2-}$  gibi iki değerli anyonlar, CA'yı inhibe etmez veya çok zayıf inhibitörler gibi hareket ederler (Simonsson and Lindskog 1982). Esasen, pH=6,0'da 2,4 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ın varlığında bile, insan CA-II izoenziminin kristal yapısında sülfat iyonunun bağlandığına dair hiçbir 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 *et al.*, 2002).

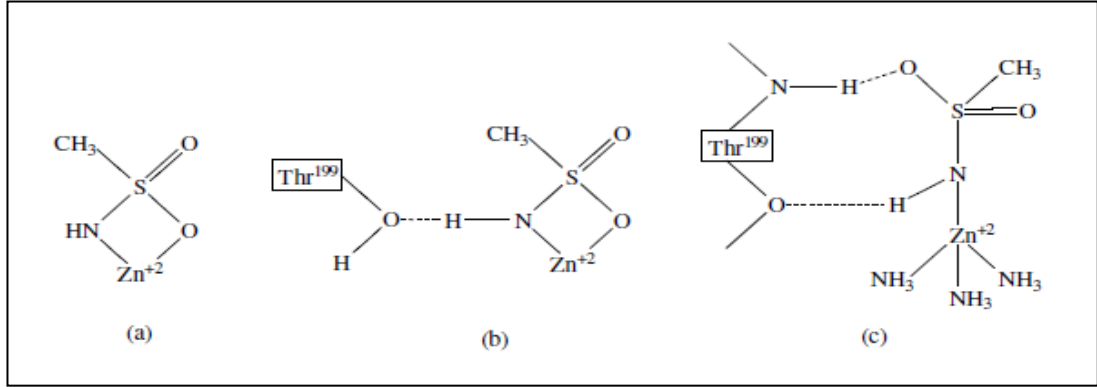


Şekil 1.16. Bazı Sülfanamidlerin açık formülleri

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).

**Tablo 1.5.** Karbonik Anhidraz izoenzimlerinin Hücre içi Yerleşimleri ve Sülfonamidlere ilgisi (Lindskog, 1997).

İzoenzim	Kataliz Aktivitesi (CO <sub>2</sub> 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 1.17.** Sulfonamidlerin Karbonik Anhidraz Enzimine Bağlanması (Özensoy, 2002).

CA'nın en güçlü organik inhibitörleri aromatik veya hetero aromatik sulfonamidlerdir fakat bu çalışmada sulfanilamid grubu içermeyen bazı vitaminlerin kordon kanı hcbCA I ve II izoenzimleri üzerine inhibisyon etkileri incelenecektir.

## 1.5.Deneyde kullanılan vitaminler ve özellikleri

### 1.5.1. K vitamini

K vitamini bir tesadüf sonucu keşfedilmiştir. Danimarka'da Henrick Dam 1929 yılında tavukların diyetinde kolesterolün gerekli olup olmadığını incelemek için deneyler yaparken tavukları, lipid çözücü maddelerle ekstrakte edilmiş bir yemle besliyordu. Yağsız diyetle beslenen tavukların kanama yüzünden öldüğünü gözlemledi (Dam *et al*, 1935). Bir başka gruba yeşil yapraklı kaba yonca verdiğinde kanama olmadığını saptadı. Böylece besinlerde antihemorajik bir faktörün varlığını keşfetmiş oldu. Bu araştırmalar yayınlandığında "Koagulationsvitamin" kelimesinin bas harfinden gelen K vitamini doğdu. 1975'de ilk defa karaciğerde K vitamini karboksilaz enzim aktivitesi tespit edildi (Ümit *et al*, 2006).

K vitamini yağda eriyen vitaminlerdendir. Temel fonksiyonu karaciğer hücrelerinde ve karaciğer dışı hücrelerde fonksiyonel önemi olan proteinlere bağlı glutamat rezidülerinin gama-karboksiglutamata (Gla) dönüştürülmesidir. Proteinlerdeki gama-karboksi glutamatın bilinen tek etkisi kalsiyum iyonu bağlamasıdır. Bu bağlama,

protein molekülündeki biyolojik etkinlik için gerekli değişikliği sağlar (Higdon *et al*, 2003 ve Zipursky *et al*, 1999).

Bu dönüşüm karaciğer hücrelerinin endoplazmik retikulumunda glutamat rezidüsünün gama-hidrojeni yerine karboksil grubu getirilmesi suretiyle yapılır. Bu reaksiyon gama-glutamil karboksilaz enzimi tarafından katalizlenir. K vitamini NADH veya NADPH varlığında aktif formuna (hidrokinon) indirgenir. Hidrokinon, epoksit vitamin K'ya oksitlenir. Bu ikinci reaksiyon, K vitamini bağımlı proteinleri aktive eden karboksilasyon reaksiyonuna bağlıdır. Sonuçta epoksit vitamin K, epoksit redüktaz aracılığıyla K vitaminine dönüşür. Epoksit redüktaz dithiol bağımlıdır ve antikoagülanlar tarafından inhibe edilir (Dilek *et al*, 2007).

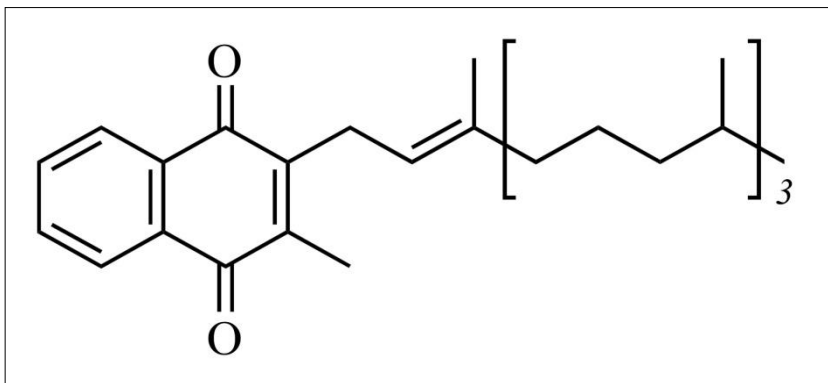
Bu döngü esnasında ilk bulunan gama-karboksi glutamatlanmış protein protrombindir. Bundan başka çeşitli pıhtılaşma faktörlerinin (faktör 7,9,10, protein C, S, Z, M) inaktif durumdan aktif duruma getirilmesi için bu modifikasyon gereklidir(Booth *et al*, 2001 ve Zipursky *et al*, 1999).

Koagülasyon proteinleri dışında; kemik, kıkırdak, akciğer, böbrek ve başka dokularda da K vitaminine bağımlı proteinler izole edilmiştir (Booth *et al*, 2001; Greer *et al*, 1999; Higdon *et al*, 2003 ve Langman, 2003).

Bunlardan iki tanesi iyi bilinen osteokalsin ve matrix Gla protein (MGP) dir. Osteokalsin, osteoblastlar tarafından sentezlenir ve kemiğin kalsifikasyonunda rol oynar. MGP ise, kıkırdak, kemik ve kan damarlarında sentezlenir. Kemik mineralizasyonunu ve arteryel damar duvarında kalsifikasyonu inhibe etmektedir (Dilek *et al*, 2007)

K vitamininin koagulasyon sistemindeki rolü keşfedildikten sonra, K vitamininin biyolojik rolü hakkında bir çok araştırmalar yapılmıştır:

1. K vitamin antagonistlerinin keşfi ve onların antikoagulasyonda farmakolojik ajanlar olarak tanınması (Commpbell *et al*, 1941).
2. Kan pıhtılaşma proteinlerinde  $\gamma$ -karboksi glutamik asidin keşfi (Nelsestuen *et al*, 1974 ve Stenflo *et al*, 1974).
3. Protein-membran etkileşimi için bir gereksinim olarak proteinlere metal bağlama özelliği veren, metal bağlayıcı bir amino asit olan  $\gamma$  -karboksi glutamik asidin tanımlanması (Esmon *et al*, 1975 ve Sperling *et al*, 1978).
4. Glutamik aside CO<sub>2</sub> bağlanmasını katalizleyen bir enzimatik aktivitenin (K vitaminine bağımlı karboksilaz) bulunması (Esmon *et al*, 1975).
5. K vitaminine bağımlı proteinlerin sentezi sırasında propeptid basamağının saptanması (Kurachi *et al*, 1982).
6. Prekürsör proteindeki  $\gamma$  -karboksilasyon tanıma bölęesinin keşfi (Furie *et al*, 1997).



**şekil 1.18.** K vitamininin moleköl yapısı



### 1.5.2. A vitamini

A vitamini ve türevleri (retinoidler), besinler içinde çeşitli şekillerde bulunurlar. Türevlerinden (vitamer) vücutta en yaygın olanı retinol'dür. Bu madde kimyaca, izopren birimlerinden oluşan doymamış bir alifatik zincirin ucunda  $\beta$ -iyonon (sikloheksenil) halkası içeren ve yağda çözünen bir primer alkoldür. Kasaplık hayvanların ve deniz balıklarının etinde, özellikle karaciğerinde ve uzun zincirli yağ asitleri ile esterleşmiş şekilde bulunur. En fazla bulunan esteri retinol palmitat'tır. Bitkisel besinler ise bunun prekürsörü olan karotenleri içerirler. Bunlar sarı veya kırmızı renkli meyve ve sebzeler, ıspanak ve pancar yaprağı gibi yeşil sebzelerdir (Kayaalp *et al*, 2000).

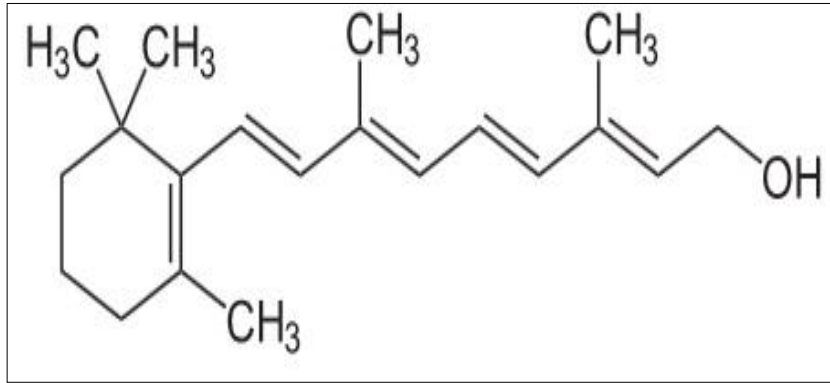
Antioksidan özellikleri olan A vitamini, bakterileri parçalayan lizozim enzimlerini içeren mukus ve mukopolisakkaridleri yapan hücrelerin gelişimi için gereklidir. A vitamini hücrelerin büyümesi ve gelişimi için gereklidir. Antienflamatuvar etkili bir madde olan A vitaminin kortikosteroidlerin olası istenmeyen etkilerinin önlenmesine de yardımcı olduğu bilinmektedir. Her ne kadar bu önleyici etki mekanizması tam olarak bilinmese de yara iyileşme sürecinde makrofaj ve monositlerin sayısında artış ve kortikosteroidlerin lizozimler üzerindeki etkisini engelleme ile gösterdiği düşünülmektedir (Reifen *et al*, 2002).

Retinoidlerin kortikosteroidlerin zararlı etkilerinin engellediği çeşitli yayınlarda bildirilmiştir. Fleksör tendon tamirinde(Greenwald *et al*, 1990), femoral kemik fraktürü iyileşmesinde(Seifter *etal*,1975), intestinal anastomoz iyileşmesinde(Phillips *et al*, 1992). A vitamininin yararlı etkileri saptanmıştır. Bozulmuş yara iyileşmesi olan kortikosteroid tedavisi altında doku iyileşme kapasitesini artırır(Ehrellich *et al*, 1973). Tavşanlardaki kortizon ile iyileşmesi engellenmiş açık yaraların A vitamini tedavisinin iyileşmeyi stimüle ettiği saptanmıştır(Hunt *et al*, 1969).

A vitamininin cilt bozuklukları, bronko-pulmoner displazi ve infeksiyon hastalıkları gibi inflamasyon durumlarında faydalı olduğu rapor edilmiştir. Çocukluk çağı pnömonilerde A vitamini takviyesi hastalığın şiddetini azaltmaktadır. Nötrofil süperoksit üretimini azaltır ve dolaşımdaki lökositleri artırır(Wiederman *et al*, 1996).

Salisilâtlar hidrokortizon ve prednizolonun iyileştirmeyi geciktirici etkileri retinoik asit uygulanarak azaltılabilir(Lee *et al*, 1970).

Vitamin A ve türevleri, hem normal embriyo gelişimi için hem de erişkin organizmada farklılaşmanın sürdürülmesi için gereklidirler (Deluca *et al*, 1991; 1995 ve Gudas *et al*, 1994). A vitamini'nin yetersiz olduğu durumlarda, embriyo segmentasyonu ve büyümesi başarısız olur, vaskülarizasyon durur ve sonuçta embriyo rezorbe olur (Maden, 1996; Thompson *et al*, 1969 ve Wellik *et al*, 1995). Erişkinde özellikle epiteliyal farklılaşma A vitamini'ne gereksinim duymaktadır. Eksikliği ise, ileri aşamada epitelin karakteristiklerini değiştirerek ölümüne sebebiyet veren skuamoz metaplazi'ye neden olmaktadır (Deluca *et al*, 1995 ve Seyba *et al*, 1993). Diğer taraftan A vitamini'nin fazlalığı embriyogenez esnasında şekil bozukluklarına sebep olurken, erişkinde membranolitik ve hepatotoksik etki yapmaktadır (Nau *et al*, 1994). Bu nedenle, retinoid dengesinin korunması, sağlıklı organizmanın normal fizyolojisinin korunması için son derece önemlidir (Roos *et al*, 2000).



**Şekil 1.19.** A vitamininin molekül yapısı

Retinoidler embriyoya annenin dolaşım sistemi vasıtasıyla ulaşmaktadır. Retinol, retinaldehit ve retinoik asidin taşınımı; bu kimyasalların gebe hayvanlara yüksek dozlarda verilmesiyle ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir (Collins *et al*, 1999; Greene, 1976; Kochhar *et al*, 1988 ve Sass *et al*, 1999).Kemirgenlerde vitellus kesesi plasentası, retinol'ün anne tarafından fetus tarafına taşınmasında önemli bir işlev üstlenmektedir. Bu işlev gebelik boyunca da önemini korumaktadır (Johansson *et al*, 1997).

### 1.5.3. B-12 vitamini

Vitamin B12 (kobalamin), ortasında kobalt atomu bulunan 4 pirol halkasından oluşmuş korrin halkasına sahip kompleks bir moleküldür. Sadece mikroorganizmalar tarafından üretilir ve memeli karaciğerinde, metilkobalamin, adenzilkobalamin ve hidroskobalamin halinde depolanır (Bolat, 2007). Kobalaminler kobalt atomuna bağlı farklı yan gruplara göre isimlendirilirler. Metil grubu ile metilkobolamin, 5'-deoksiadenozil grubu ile deoksiadenozil kobolamin veya koenzim B12, hidrosil grubu ile hidrosi kobolamin, su molekülü ile akuakobalamin, siyanid ile siyanokobolamin veya B12 vitamini olarak adlandırılırlar (Burtis *et al*, 1994).

B12 vitamini sadece mikroorganizmalar tarafından sentezlenir. Diğer suda eriyen vitaminlerden farklı olarak metil kobalamin, adenzil kobalamin ve hidrosi kobalamin şeklinde karacigerde 1 mg B12 vitamini depo edilir. İnsanlar için günlük B12 vitamini ihtiyacı yaklaşık 0,5 mg olduğu için karaciğerde depolanan B12 vitamini 2000 günlük ihtiyacı karşılayabilir. Ancak serum B12 vitamini düzeyi, fonksiyonel eksikliği göstermediği bu süre gerçekte daha kısadır (Burtis *et al*, 1994). Bunun için serum veya idrar metil malonik asit düzeyi bilinmelidir (Gultepe *et al*, 2003).

Yiyeceklerdeki kobalamin genellikle koenzim formunda (deoksiadenozil kobalamin ve metil kobalamin) ve proteinlere spesifik olmayan şekilde bağlanarak alınır. Kobalamin asidik mide ortamında pepsin ile gıdalardan ayrılır ve midede tükürük R proteini olan haptokorrine bağlanır. Bu kompleks pankreatik enzimlerce sindirilinceye kadar barsakta ilerler. Bu proteinin sindirilmesi ile serbest kalan B12 vitamini mide mukoza hücrelerinde üretilen bir glikoprotein olan intrinsik faktöre (IF) bağlanır. Distal ileumda, B12 vitamini - IF kompleksi mukoza epitel hücreleri yüzeyindeki reseptörlere bağlanıp hücre içine alınır. Mukoza epitel hücresi içinde B12 vitamini - IF kompleksi ayrılır. Mukozal kapiller dolaşıma geçerek portal ven

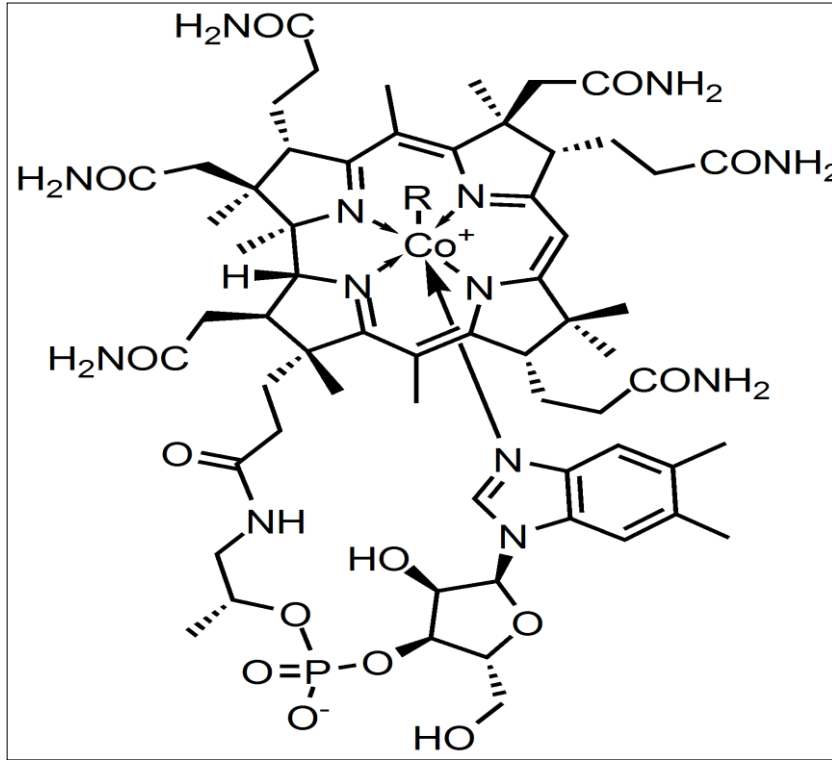
sistemi ile karaciğere taşınan B12 vitamininin tamamına yakını karaciğer tarafından tutulur.

Eğer B12 vitamini miktarı hepatosit reseptörlerinin kapasitesini aşar ise; fazla olan miktar böbrekler yolu ile atılır. Karaciğerde koenzim formunda depolanır ve fizyolojik ihtiyacı karşılamak için buradan dolaşıma salınır. Kobalamin dolayında serbest formda bulunmayıp kobalamin taşıyıcı proteinler olan transkobalaminler ile birliktedir. Transkobalaminin üç farklı formu vardır (Burtis, 1994);

Transkobalamin (TC) I, dolaşımdaki B12 vitamininin %80'ini bağlar. Toplam hücre içi alımının %1'ine aracılık eder. Vitamini plazmadan dokulara taşıma fonksiyonu yoktur. B12 vitamini TC I'e bağlı olarak karaciğerde depolanır. Karaciğer depo formu safra ile atılıp enterohepatik dolaşıma girer.

TC III, yapıca TC I'e benzer. Birçok kobalamin türevini bağlayabilir. Taşıyıcı fonksiyonu var gibi görünmekle birlikte TC III'ün fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Ancak, kandaki zararlı ve metabolik olarak işe yaramayan kobalamin analoglarının toplanmasını sağladığı düşünülür (Carmel, 1981). Bazı çalışmalar TC III'ün B12 vitaminini hızla ve sadece karaciğere götürdüğünü belirtir (Hall, 1989). Plazmada B12 vitamini taşıyan en önemli protein â-globulin yapısındaki TC II'dir. TC II, birçok doku tarafından sentezlenmekle birlikte temel olarak karaciğerde sentezlenir. TC II'nin her molekülü bir B12 vitamini bağlama kapasitesine sahiptir. Plazma TC II, B12 vitaminini enterosit içinden dolaşıma taşır. Dolaşımdaki total kobalaminin %10-30'unu bağlar ve yarı ömrü 6 - 9 dakikadır. B12 vitamini distal ileumda IF'den ayrıldıktan sonra TC II'ye bağlanır ve B12 vitaminini tüm dokulara dağıtmak için portal dolaşıma geçer (Hall, 1989). TC II, B12 vitamini için IF'den daha spesifiktir. TC II - B12 vitamini kompleksi birçok dokuda bulunan TC II reseptörlerine hızla bağlanarak endositoz ile hücre içine alınır. Lizozom içindeki düşük pH etkisiyle TC II, B12 vitamininden ayrılarak dolaşıma geri döner.

Serbestleşen B12 vitamini sitozolde metil kobalamine dönüşür ya da mitokondri içine girerek 5'-adenozilkobalamine dönüşür. TC II sadece metabolik olarak aktif kobalaminleri taşır (Carmel *et al*, 1981 ve Jacob *et al*, 1980). Karaciğer hücre harabiyetinde karaciğerdeki B12 vitamini bağlayan faktörlerin hasar görmesi de plazma B12 vitamini ve diğer vitaminlerin dolaşıma salınımını artırır (Bake *et al* r, 1956 ve Sorrel *et al*, 1974). Kronik karaciğer hastalıklarında artmış plazma B12 vitamini düzeyindeki azalma karaciger fonksiyonlarında düzelmeye işaret edebilir (Baker *et al*, 1998). B12 vitamini ve folik asidin dokudaki düzeyleri tamamen dolduğunda hepatik DNA sentezi çok belirgin şekilde artar ve karaciğer rejenerasyonu olabilir (Leevy *et al*, 1985). Aktif formlar olan metil kobalamin ve 5'-adenozilkobalamin iki önemli reaksiyonda koenzim olarak rol alır(Kayadibi *et al*, 2006)

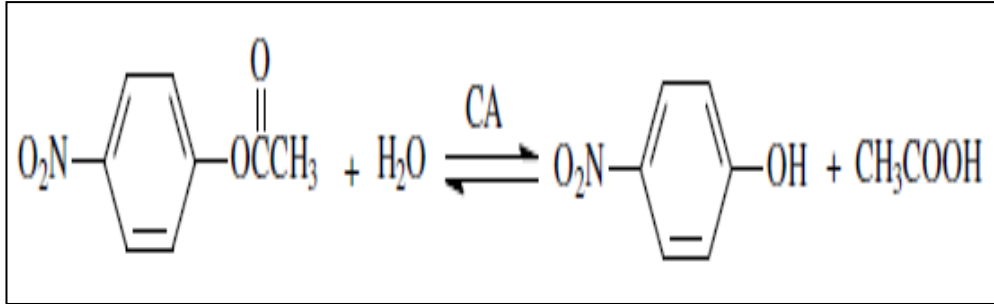


Şekil 1.20. B-12 vitamininin molekül yapısı

## 1.6. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayin Metodları

### 1.6.1. Esteraz Aktivitesi

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 ve p-nitro fenolata 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 absorbansı verdiği bölgedir.

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

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

P. Chappuis ve arkadaşları (1998) yeni doğanların eritrositlerinde yaptıkları bir eser element analizinde, karbonik anhidrazın kofaktörü olan çinko elementinin miktarını ve hangi patolojik vakalarla ilgisinin olduğunu araştırmışlardır .

Brigitte 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  $0.55 \pm 0.17$   $\mu\text{mol/L}$ , çinko  $20.4 \pm 3.8$   $\mu\text{mol/L}$  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  $1.05$   $\text{mmol/l}$  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 bir çok 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.

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 ve Parkkila, 1996; Christie *et al.*, 1997; Raisanen *et al.*, 1999).

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 1975 yılında Whitney'in, 1976'da Chanpagnol'un, 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-Zn<sup>2+</sup> afinitekolonu kullanarak 0,74 EÜ/mg protein spesifik aktivite, %76 verimle ve 4,6 kat saflaştırmışlardır.

Karbonik anhidraz enzimleri pek çok dokudan saflaştırılmış ve moleköl kütleleri belirlenmiştir. Burt ve arkadaşlarının 1992'de yaptıkları bir çalışmada literatürde yüz sineği olarak ifade edilen *Musca autumnalis* larvalarından CA saflaştırılmış SDS-PAGE yapılarak enzimin saflığı kontrol edilmiş ve moleköl kütlesi 32.000 Da olarak belirlenmiştir.

Daha sonra enzimin doğal moleköl 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 moleköl kütlesi 32.000 Da olarak belirlenmiştir.

CA enzimleri hayvanlarda ve özellikle de insan hastalıklarının bir çoğunun tedavisinde kullanılan ilaçlar için hedef enzim olmuştur. Asetazolamid, dorzolamid ve brinzolamid gibi sülfonamid türevleri olan ilaçlar karbonik anhidraz izoenzimlerinin kuvvetli inhibitörleridirler (Bülböl *et al.*, 2003). Örneğin insanlarda glokom hastalığında CA inhibitörleri farmakolojik ajan olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Casini *et al.*, 2002; Gülçin *et al.*, 2004).

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.

### **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 aktifleştirilmiş 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,  $\beta$ -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 NaHCO<sub>3</sub>, pH=8,8 (Sepharose matriksleri üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon): 16,8 g NaHCO<sub>3</sub>, 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH=8,7 (afinite jelinin dengelenmesinde kullanılan tampon): 3,0275 g Tris ve 14,2 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH=8,7 (hemolizatın tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanmasında kullanılan tampon) 3,0275 g Tris ve 3,124 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 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<sub>3</sub>COO / 0,5 M NaClO<sub>4</sub>, pH= 5,6 (kolona tutunmuş CA-II enziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 2,04 g NaCH<sub>3</sub>COO.3H<sub>2</sub>O ve 9,187 g NaClO<sub>4</sub> 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<sub>4</sub>, pH=7,4 (Esteraz aktivitesi ve diyalizde kullanılan tampon çözelti): 6,055 g Tris 950 ml destile su içerisinde çözülerek, 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile pH'sı 7,4'e getirildikten sonra hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.
7. %0,02'lik NaN<sub>3</sub> çözeltisi (Afinite kolonunun bakterilerden korunması için kullanılan çözelti): 20 mg NaN<sub>3</sub> 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 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 ( $\text{CO}_2$ -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**

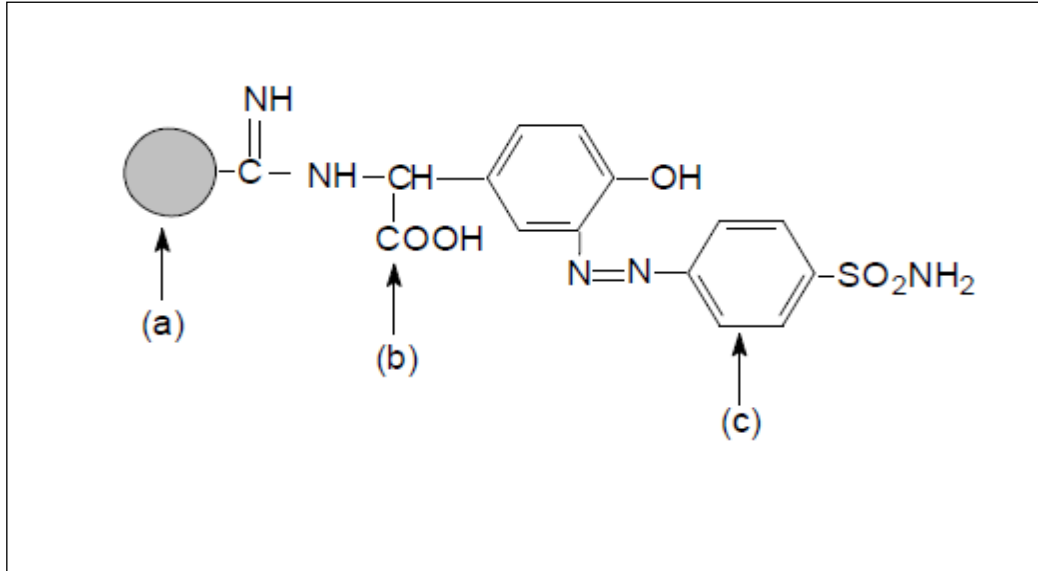
#### **3.2.2.1. Esteraz aktivitesi tayini**

Kinetik çalışmalarda karbonik anhidraz aktivitesi ölçümleri bu yöntemle yapıldı. Bu yöntem karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Prensipte 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-SO<sub>4</sub> 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. adımıdaki 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. a) 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 NaHCO<sub>3</sub> (0.1 M, pH 10.0) tamponu ile yıkandı. Daha sonra 20 mL tamponun içerisinde 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 NaHCO<sub>3</sub> (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 NaNO<sub>2</sub> 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-SO<sub>4</sub> (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 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 yığılma jeli hazırlandı. Jelin üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarının oluşması için tarak dikkatlice yerleştirildi.

Yığılma jelinin katılması beklenirken ıslatılmış süzgeç kağıdı sistemin üzerine kapatıldı ve kuruması önendi. Yığılma jeli katıldıktan 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, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>] 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.

### **3.2.5.Kordon Kanından Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Saflaştırılması**

#### **3.2.5.1. Kordon kanının Temini ve hemolizat hazırlanması**

Deneyde kullanılan kordon kanı Erzincan devlet hastanesinden taze olarak 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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (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.

### **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 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.

### **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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH:8,7) çözeltisi ile yıkandı. Böylece karbonik anhidraz enzimi kolona tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaştırılmış oldu. Sonra 1M NaCl/25mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH:6,3) tamponu tatbik edilerek CAI enzimi; daha sonra 0,1 M NaCH<sub>3</sub>COO/0,5 M NaClO<sub>4</sub> (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

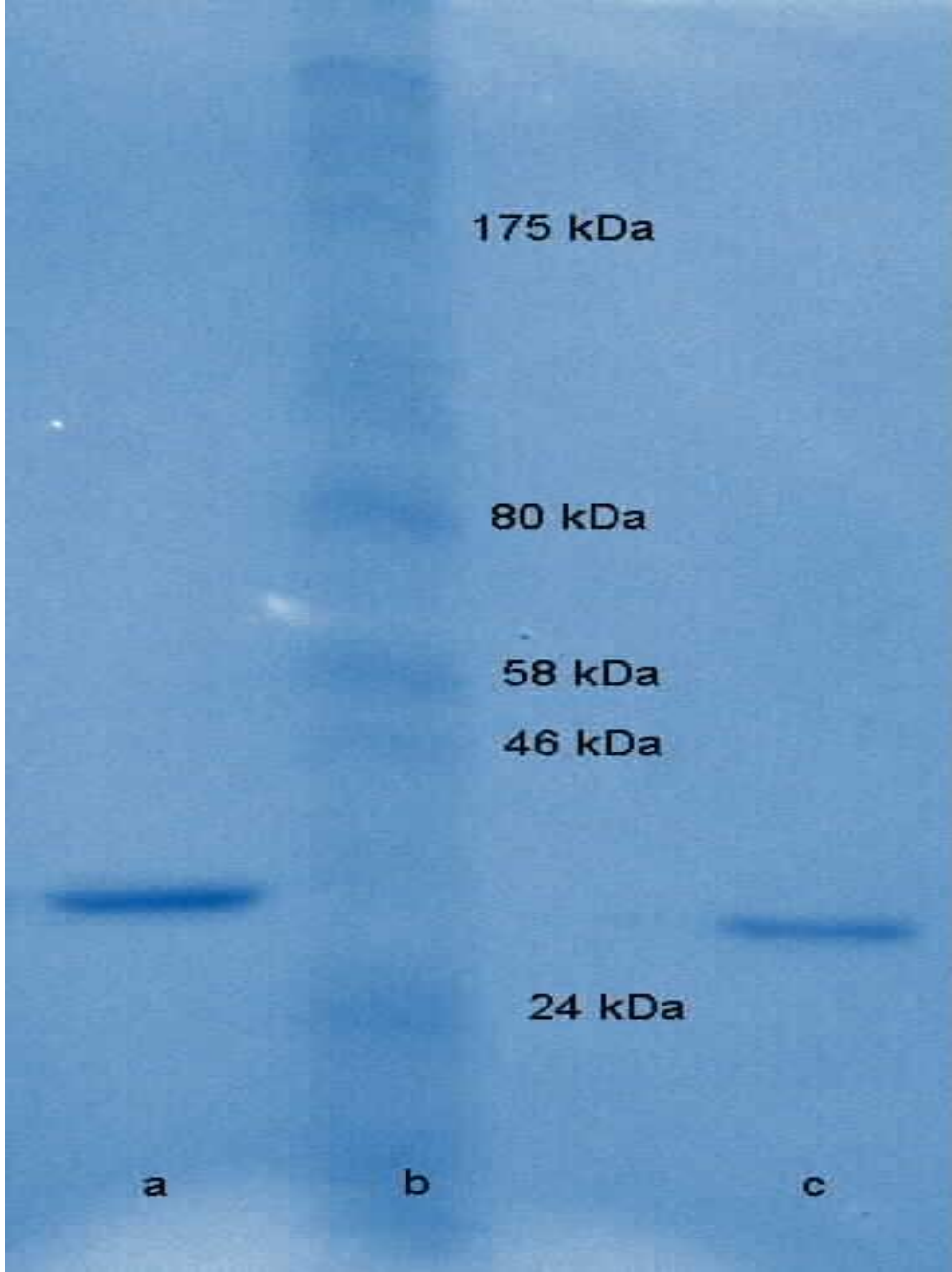
Tez kapsamında yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, bu bölümde çizelge ve şekiller ile gösterildi. Tablo 4.1 ve 4.2’de, kordon kanı CA-I ve CA-II izoenzimlerinin Sepharose 4B-L-tirozin-sulfanilamid afinite kolon materyali ile saflaştırılma basamaklarının sonuçlarını vermektedir. Ayrıca afinite kromatografisi yöntemiyle saflaştırma sonucu yapılan SDS-PAGE sonuçları verilmektedir (Şekil 4.1 ).

**Tablo 4.1.** Kordon kanı CA-I enziminin 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 (EÜ)	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	% verim	Saflaştırma katsayısı
Hemolizat	138,02	50,00	17,70	885	6901,00	7,793	100	1,00
Afinite kromatografisi	417,60	12,50	0,3528	4,41	5220,00	1183,67	75,64	151,88

**Tablo 4.2.** Kordon kanı CA-II enziminin 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 (EÜ)	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	% verim	Saflaştırma katsayısı
Hemolizat	138,02	50,00	17,70	885	6901,00	7,793	100	1,00
Afinite kromatografisi	747,12	6,60	0,1181	0,78	4931,00	6321,79	71,45	811,21



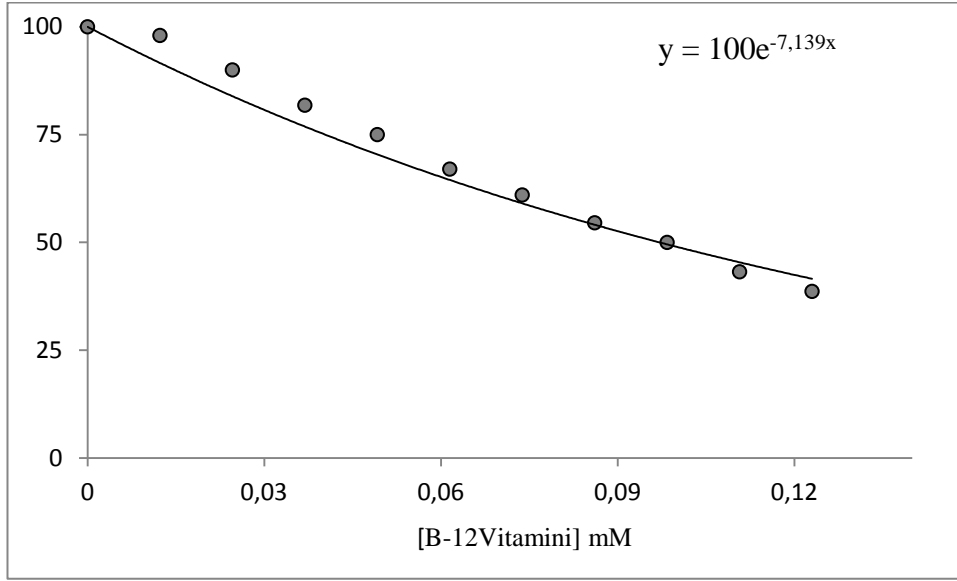
**Şekil 4.1.** Saflaştırılmış CA izoenzimlerinin SDS-PAGE fotoğrafı kanal b: standard proteinler, 1: maltose bağlayıcı protein –  $\beta$ - galactosidase (175 kDa); 2: paramyosin (80 kDa); 3: kitin bağlayıcı domain (58 kDa); 4: CBD–Mkse Intein–2CBD ( 46 kDa)5: soya tripsin inhibitörü (24 kDa). Kanal a: hcbCA II, kanal c: hcbCA I

#### 4.1.2. İnhibisyon çalışmaları sonuçları

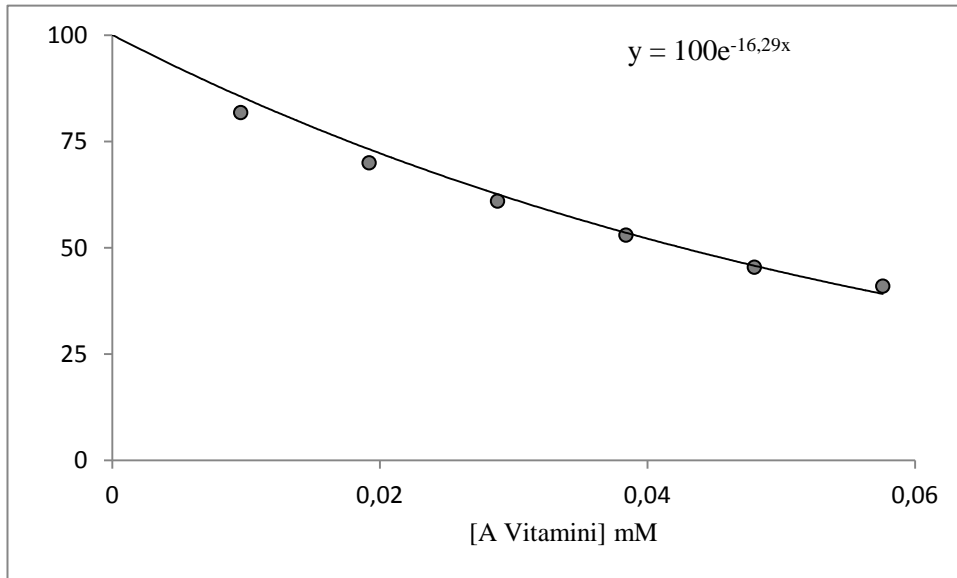
Çalışmamızda karbonik anhidraz enziminin daha önce bilinen inhibitörlerine yapısal olarak benzeyen vitaminler seçilmiştir. Kordon kanı karbonik anhidraz I ve II izoenzim aktivitesi üzerine A vitamini, B-12 vitamini, K vitamini (K<sub>3</sub>), B-2 vitamini, D vitamini, C vitamini, Biotin, E vitamini, B-6 vitamini, B-5 vitamini ve Folik asitin inhibisyon etkilerini belirlemek amacıyla bu bileşiklerin stok çözeltileri hazırlandı.

A, D, E ve K vitaminleri DMSO'da, diğer vitaminlerin ise saf su'da çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden değişik konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak kordon kanından saflaştırılan karbonik anhidraz I ve II izoenzim aktiviteleri üzerine etkileri araştırıldı. Konsantrasyona karşı % aktivite (%aktivite-[I]) olarak oluşturulan grafikler Şekil 4.2-4.7'de gösterildi. Eğrilerin denkleminde  $IC_{50}$  değerleri hesaplandı.

Bu inhibitörlerin  $K_i$  değerlerini belirlemek amacıyla, üç sabit inhibitör konsantrasyonunda uygun 5 farklı substrat konsantrasyonu için elde edilen aktivite değerleri ile her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafik denkleminde yarı yarışmalı ve yarışmasız inhibisyon için  $V_{max}=V_i(1+[I]/K_i)$  formülünden yararlanılarak  $K_i$  değerleri belirlendi (Şekil 4.8-4.13)

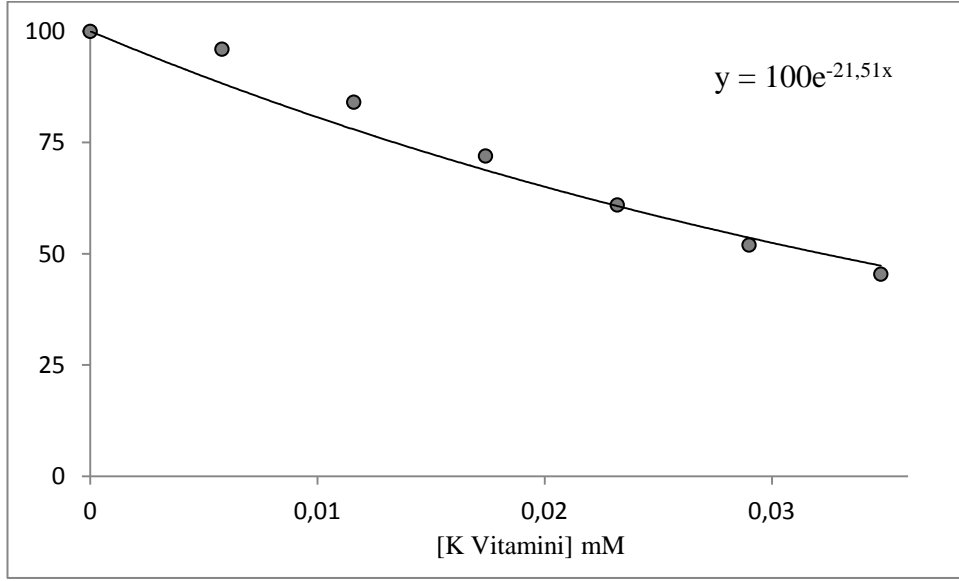


**Şekil 4.2.** B-12 vitamininin hcbCA I izoenzimine karşı IC<sub>50</sub> grafiği.

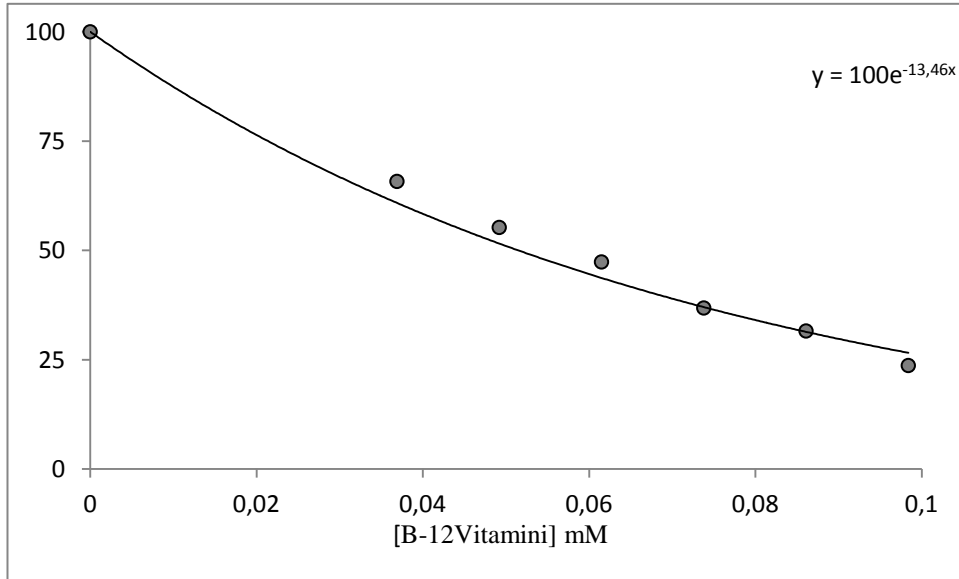


**Şekil 4.3.** A vitamininin hcbCA I izoenzimine karşı IC<sub>50</sub> grafiği.

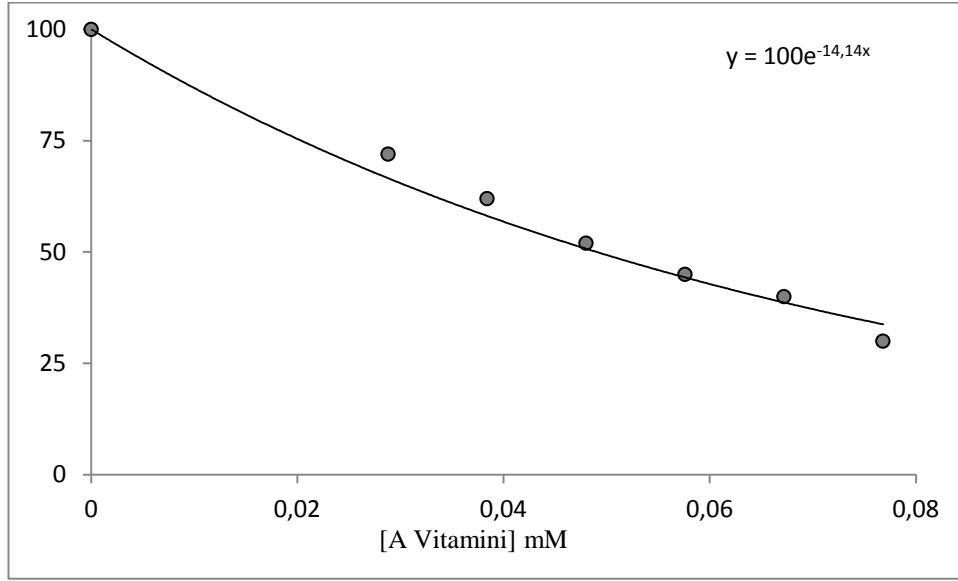




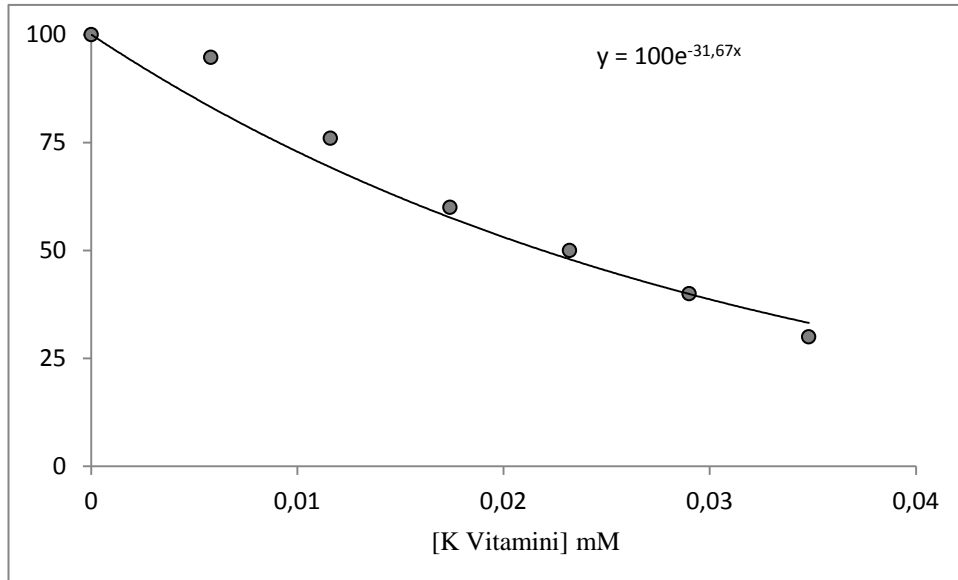
Şekil 4.4. K vitamininin hcbCA I izoenzimine karşı IC<sub>50</sub> grafiği.



Şekil 4.5. B-12 vitamininin hcbCA II izoenzimine karşı IC<sub>50</sub> grafiği.



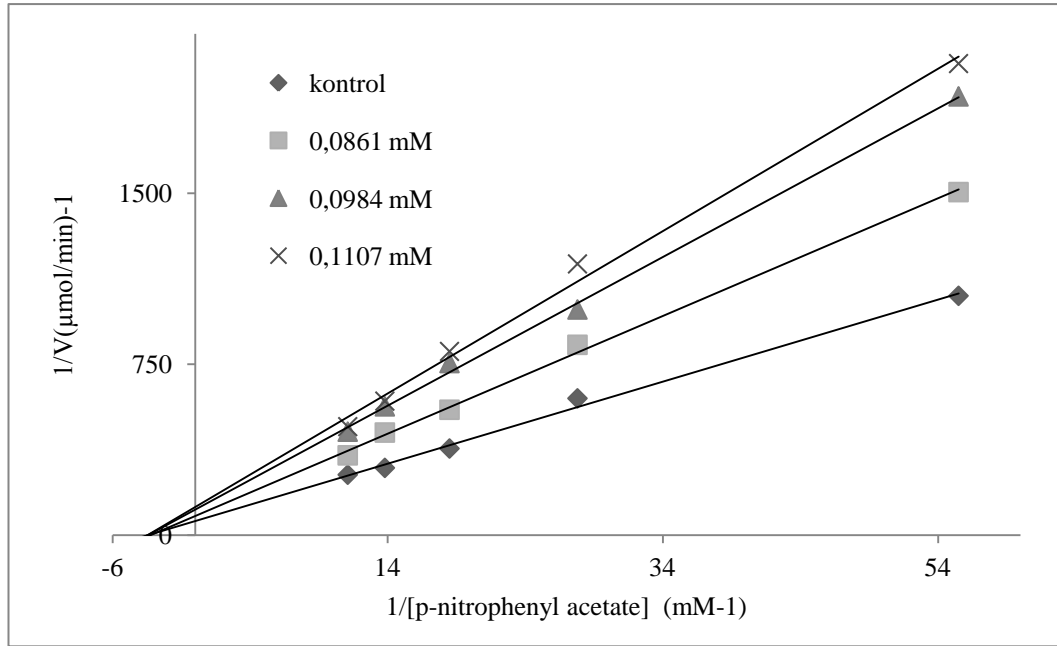
Şekil 4.6. A vitamininin hcbCA II izoenzimine karşı IC<sub>50</sub> grafiği.

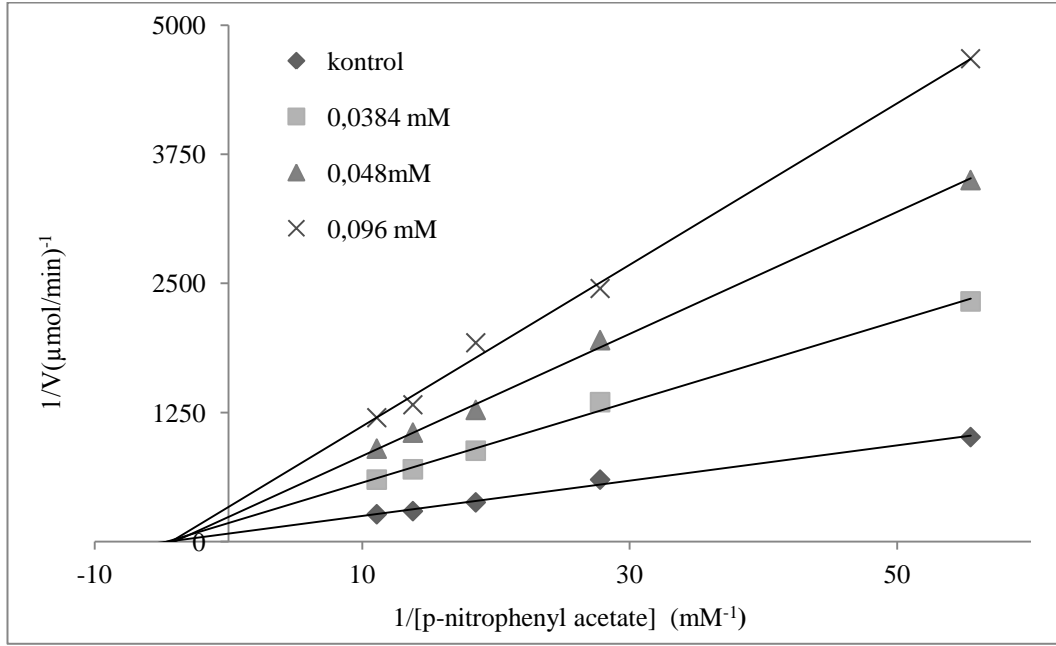


Şekil 4.7. K vitamininin hcbCA II izoenzimine karşı IC<sub>50</sub> grafiği.

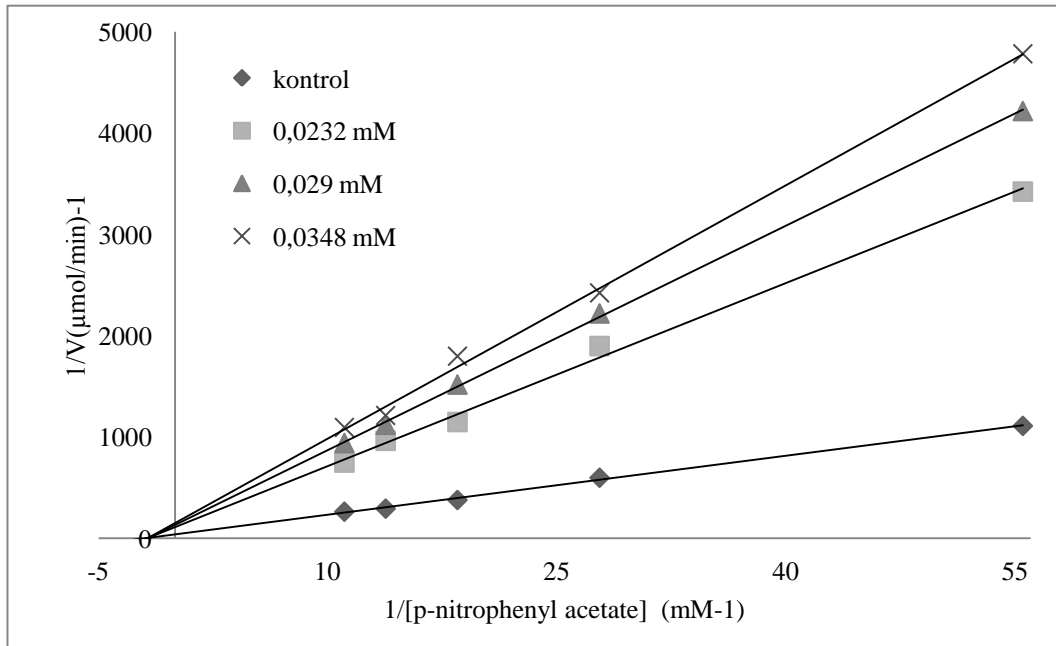
**Tablo 4.3.** Denemesi yapılan vitaminlerin IC<sub>50</sub> değerleri.

İnhibitör	CA-I IC <sub>50</sub> değeri (mM)	CA-II IC <sub>50</sub> değeri (mM)
B-12 vitamini	0,0971	0,0514
A vitamini	0,0426	0,049
K vitamini	0,0322	0,0218

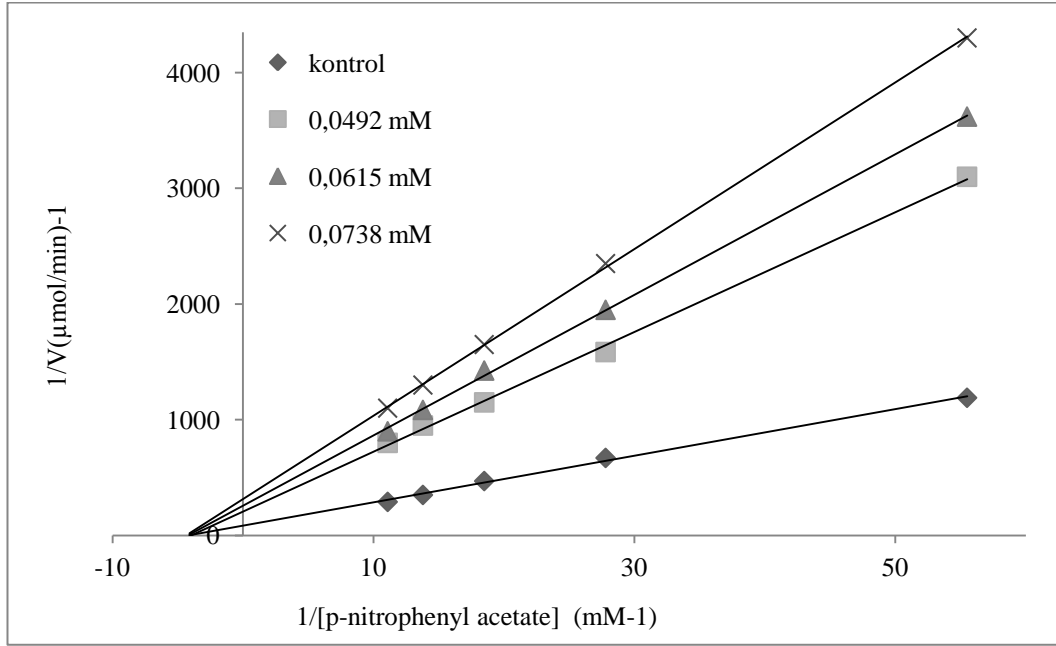
**Şekil 4.8.** B-12 vitamininin hcbCA I izoenzimine karşı K<sub>i</sub> grafiği.



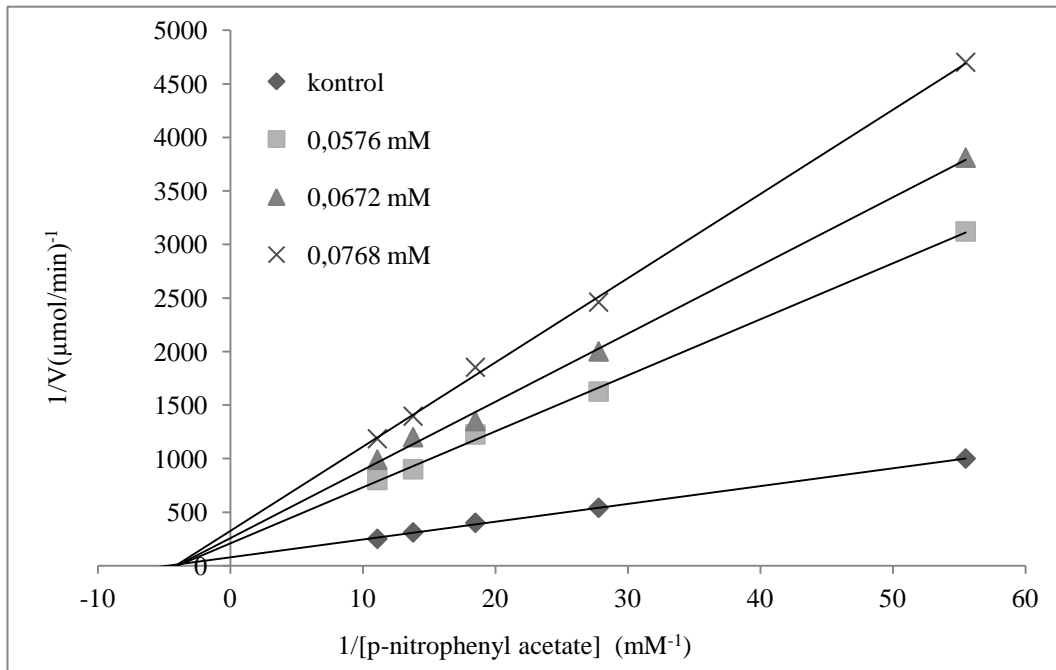
Şekil 4.9. A vitamininin hcbCA I izoenzimine karşı  $K_i$  grafiği.



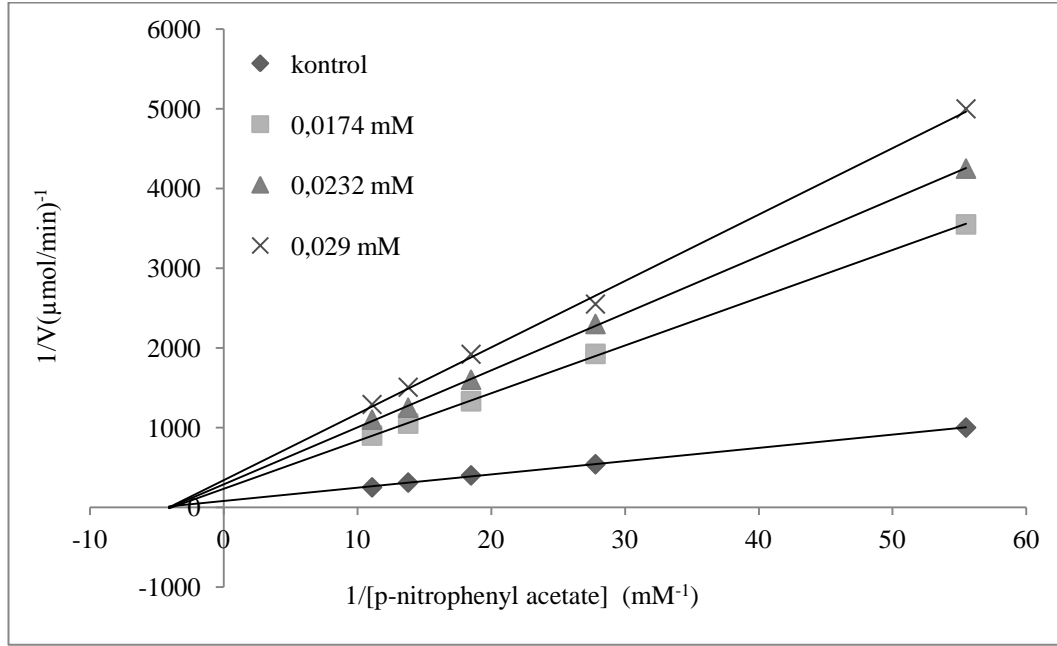
Şekil 4.10. K vitamininin hcbCA I izoenzimine karşı  $K_i$  grafiği.



Şekil 4.11. B-12 vitamininin hcbCA II izoenzimine karşı  $K_i$  grafiği.



Şekil 4.12. A vitamininin hcbCA II izoenzimine karşı  $K_i$  grafiği.



Şekil 4.13. K vitamininin hcbCA II izoenzimine karşı  $K_i$  grafiği.

Tablo 4.4. Denemesi yapılan vitaminlerin  $K_i$  değerleri.

İnhibitör	hcbCA I $K_i$ değeri (mM)	İnhibisyon türü	hcbCA II $K_i$ değeri (mM)	İnhibisyon türü
B-12 vitamini	0,158	yarışmasız	0,03	yarışmasız
A vitamini	0,027	yarışmasız	0,0295	yarışmasız
K vitamini	0,0117	yarışmasız	0,0086	yarışmasız

## 4.2. Tartışma

Bu çalışmamızda belirli ölçüde saflaştırılarak, saf izoenzimler üzerinde farklı vitaminlerin 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 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 4.1 ve 4.2 de görüldüğü gibi hcbCA I enzimi afinite kromatografisi ile kordon kanından, spesifik aktivitesi 1183,67 (EÜ/mg protein) olan, %75,64 verimle ve yaklaşık 151,88 kat; hcbCA II enzimi ise, spesifik aktivitesi 6321,79 (EÜ/mg protein) olan, %71,45 verimle ve yaklaşık 811,21 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-Zn<sup>2+</sup> 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 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.

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  $0.55 \pm 0.17$   $\mu\text{mol/L}$ , çinko  $20.4 \pm 3.8$   $\mu\text{mol/L}$  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 bir çok 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.

Kordon kanından affinite tekniğiyle saflaştırdığımız karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri üzerinde *in vitro* inhibisyon etkileri araştırılmıştır. İnhibisyona neden olan vitaminlerin 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 vitamin konsantrasyonu hesaplanmaktadır. Fakat inhibisyon tipinin belirlenmesi için  $K_i$  değerinin hesaplanması gerekmektedir.

Elde edilen sonuçlara göre deneyde kullanılan vitaminlere bakıldığında da vitaminlerden B-2 vitamini, B-5 vitamini, B-6 vitamini, C vitamini, D vitamini ve Folik asitin hcbCA I ve II izoenzimleri üzerine inhibisyonu gözlenmemiş olup, K vitamini ( $IC_{50}$  mM; hcbCA I: 0,0322; hcbCA II: 0,0218), A vitamini ( $IC_{50}$  mM; hcbCA I: 0,0426; hcbCA II: 0,049), B-12 vitamininin ( $IC_{50}$  mM; hcbCA I: 0,0971; hcbCA II: 0,0514) hcbCA I ve II izoenzimleri üzerine inhibisyonu gözlenmiştir. Uygulanan vitaminler içinde, çok düşük konsantrasyonda aktiviteyi % 50 azaltması ile hcbCA I ve II izoenzimleri üzerinde denediğimiz en kuvvetli inhibitör K vitamini olarak tespit edilmiştir. Bunun yanısıra B-12 vitamini deneyde kullanılan vitaminler arasında en az inhibisyon etkisine sahip olmasıyla dikkat çekmiştir. Ayrıca A vitamini, K vitamini ve B-12 vitaminleri yarışmasız olarak inhibisyon etkisi göstermiştir.

Sonuç olarak bu tez kapsamında;

1. İnsan kordon kanından Karbonik anhidrazın I ve II izoenzimlerinin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir.

2. Çalışma sonucunda kordon kanı CA I enzimi % 75,64 verimle yaklaşık 151,88 kat saflaştırılabilmektedir. Enzimin saflığı elektroforezle kontrol edilerek tek bant gözlenmiştir.

3. Kordon kanı CA II enzimi % 71,45 verimle yaklaşık 811,21 kat saflaştırılabilmektedir. Enzimin saflığı elektroforezle kontrol edilerek tek bant gözlenmiştir.

4. Kordon kanı CA I ve II izoenzimleri üzerine bazı vitaminlerin inhibisyon etkileri incelenmiştir. Bu amaçla Avitamini, B-12 vitamini, K vitamini ( $K_3$ ), B-2 vitamini, D vitamini, C vitamini, Biotin, E vitamini, B-6 vitamini, B-5 vitamini ve Folik asitin enzim üzerine inhibisyon etkileri incelenmiştir.

5. hcbCA I ve II izoenzimleri üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Avitamini, B-12 vitamini ve K vitamini ( $K_3$ ) için  $IC_{50}$  ve  $K_i$  değerleri hesaplanmış ve inhibisyon tipleri yarışmasız olarak belirlenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Abbate, F., Supuran, C. T., Scozzafava, A., Orioli, P., Stubbs, M. T., Klebe, G., Nonaromatic sulfonamide group as an ideal anchor for potent human carbonic anhydrase inhibitors: Role of hydrogen-bonding networks in ligand binding and drug design. *J Med Chem*, 45: 3583–3587 (2002).
- Ahmed, S., James, K., Owen, C. P., Patel, C. K., Patel, M., Acid dissociation constant: A potential physicochemical factor in the inhibition of the enzyme estrone sulfatase (ES). *Bioorg Med Chem Lett*, 11: 899–902 (2001).
- Antel, J., Weber, A., Sotriffer, C. A., Klebe, G., Multiple binding modes observed in X-ray structures of carbonic anhydrase-inhibitor complexes and elsewhere: Consequences for structure-based drug design. In: Supuran, C. T., Scozzafava, A., Conway, J., editors. *Carbonic anhydrase—Its inhibitors and activators*. Boca Raton, FL: CRC Press, 45–66 (2004).
- 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).
- 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).
- Arslan, O., “Biyomolükeller Teori ve Uygulamaları ile”, Balıkesir, (2003).
- Aydoğan, S., “Yönlendirilmiş Mutagenез ile Mutant CAII Geninin Eldesi ve Mutant Proteinlerin inhibitörlere Karşı ilgisinin Araştırılması”, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, (2006).

- Baker, H., Pasher, I., Dolger, H.P., Sobotka, H., Vitamin B12 excretion as an indeks of hepatic disorder, *Clin. Chem.* 2:328-330, (1956).
- Baker, H., Leevy, C.B., Angelis, B., Frank, O., Baker, E., Cobalamin (vitamin B12) and holotranscobalamin changes in plasma and liver tissue in alcoholics with liver disease, *J. of the American College of Nutrition*, 17:235-238, 1998.
- 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).
- Bayram, E., Şentürk, M., Küfrevioğlu, Ö.İ., Supuran, C.T., In vitro inhibition of salicylic acid derivatives on human cytosolic carbonic anhydrase isozymes I and II, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16: 9101-9105 (2008).
- Bayram, T., “Kopek Eritrositlerinden Afinite Kromatografisi ile Saflastırılan Karbonik Anhidraz Enziminin Sulfonamidlerle İnhibisyon Kinetiğinin İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, (2006).
- 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).
- Beydemir, Ş., Gülçin, İ., Effect of melatonin on carbonic anhydrase from human erythrocyte in vitro and from rat erythrocyte in vivo. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19: 193-197 (2004).
- Bingöl, G., *Biyokimya*. Güven Matbaası. Ankara, 169 – 174 (1983).
- Bolat, B., İlk atak psikoz, depresyon ve anksiyete hastalarında yağ asit, folat ve kobalamin metabolizmaları ile Prolidaz enzim aktivitesinin incelenmesi, uzmanlık tezi, Gülhane askeri tıp akademisi, İstanbul, 36, (2007).

- Bollog, D. M., Rozycki, M. D., and Edelstein, S. J., "Protein Purification Methods", Second Edition, Wiley-Liss, Inc. New-York, (1996).
- Boriack-Sjodin, P. A., Heck, R. W., Laipis, P. J., Silverman, D. N. and Christianson, D.W., Structure determination of murine mitochondrial carbonic anhydrase. V at 2.45-Å resolution: implications for catalytic proton transfer and inhibitor design. *Proc. Natl. Acad.Sci., USA*, 92: 10949 – 10953 (1995).
- Booth S, Saltzman EA. Vitamin K: Structure and function. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. London, England: (2001).
- 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).
- Burtis, C.A., Ashwood, E.R., *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 2nd Edition, W.B. Saunders Company, Pennsylvania,( 1994).
- 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. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 10: 2561 (2002).
- Briganti, F., Pierattelli, R., Scozzafava, A., Supuran, C. T., Carbonic anhydrase inhibitors. Part 37. Novel classes of carbonic anhydrase inhibitors and their interaction with the native and cobalt-substituted enzyme: Kinetic and spectroscopic investigations. *Eur J Med Chem*, 31: 1001–1010 (1996).
- Cabiscol, E., Levine, R.L., The phosphatase activity of carbonic anhydrase III is reversibly regulated by glutathiolation. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America* 93 (9): 4170-4174 (1996).
- Campbell H.A., Link K.P.: Studies on the hemorrhagic agent. *J.Biol.Chem.*, 138:21-26,(1941).

- Clanis, Y., D., "Matrix Evaluation for Preparative High-Performance affinity Chromatography", *J. Chromatogr.*, 407, Pt. A, 179-187 (1990).
- Camarasa, M. J., Fernandez-Resa, P., Garcia-Lopez, M. T., De las Heras FG, Mendez-Castrillon PP, Alarcon B, Carrasco L. Uridine 50-diphosphate glucose analogues. Inhibitors of protein glycosylation that show antiviral activity. *J Med Chem* , 28: 40–46 (1995).
- Carmel, R., Cobalamin-binding proteins of man, *Contemporary/Oncology*, 79-129, (1981).
- 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).
- 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).
- 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).
- Chegwidden, W. R., Dodgson, S. J., and Spencer, I. M., "In the Carbonic Anhydrase New Horizons", Birkhauser Verlag, Basel, 343 (2000).
- Collins, M.D., Mao, G.E., Teratology of retinoids, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39, 399-430, (1999).
- Colowick, S.P., Kaplan, N.O., *Methods In Enzymology*. Academic Pres., Inc., London.55 (1987).
- Çelik, İ., Bazı Pestisit ve Bitki Büyüme Regülatörlerinin Sığır ve insan Eritrosit Karbonik Anhidraz izoenzimleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması (doktora tezi). Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Van, (1995).

- Dam H. Antihemorrhagic vitamin of the chick; occurrence and chemical nature. *Nature* 135:652-3, (1935).
- DeLuca, L.M., Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia, *FASEB J* 5, 2924-2933, (1991).
- DeLuca, L.M., Darwiche, N., Jones, C.S., Scita, G., Retinoids in differentiation and neoplasia, *Sci Am Sci Med* 2, 28-32, (1995).
- Denizli, A., ve Pişkin, E., “Heparin Immobilized Polyhydroxyethylmethacrylate “microbeads for cholesterol removal: A Preliminary Report”, *J. Chromatogr. B.*, 670: 157-161 (1995).
- Devlin T M. *Biochemistry with Clinical Correlations*. Kanada, (2002).
- Dilek, Ç., Geç Kvitamini eksikliğinde görülen nörolojik sekeller, *Tıpta uzmanlık tezi*, Kayseri, 5, (2007).
- Ehrlich HP, Tarver H, Hunt TK. Effects of vitamin A and glucocorticoids upon inflammation and collagen synthesis. *Ann Surg.* 177(2):222-7(1973).
- 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).
- Esmon C.T., and Sadowski J.A., Suttie J.W.: A new carboxylation reaction. The vitamin K-dependent incorporation of  $H^{14}CO_3$  into prothrombin. *J. Biol. Chem.*, 250:4744-4748, (1975).
- 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., Purufication and characterization of carbonic anhydrase from the saliva of the rat. *J. Biol. Chem*, 259(9): 5447-53 (1984).



- Fiore, A., De Simone, G., Menchise, V., Pedone, C., Antel, J., Wurl, M., Casini A., Scozzafava, A., and Supuran, C. T., “Carbonic Anhydrase Inhibitors. Zonisamide is an effective Inhibitor of the Cytosolic Isozyme II and Mitochondrial Isozyme V Solution and X-Ray Crystallographic Studies”, Elsevier Science, 15: 2315 (2005).
- Furie B.C.,Ratcliffe J.,Tward J.,Jorgensen M.J.,Blaszowsky L.,DiMichele D.,Furie ,B.:The carboxylation recognition site is sufficient to direct vitamin K-dependent carboxylation on an adjacent glutamate-rich region of thrombin in a propeptide-thrombin chimera.J.Biol.Chem.,272:28258-28262, (1997).
- Geers, C., and Gros, G., “Carbon Dioxide Transport and Carbonic Anhydrase in Blood and Muscle”, *Physiological Reviews*, 80: 681 (2000).
- 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).
- Gordon, A., Price, H., Mood stabilization and weight loss with topiramate. *Am J Psychiatry* , 156: 968–969(1996).
- Gözükara, E., *Enzimler. Biyokimya. Nobel Tıp Kitabevleri*, Ankara, 572-576(1997).
- Greenwald DP, Sharzer LA, Padawer J, Levenson SM, Seifter E. Zone II flexor tendon repair: effects of vitamins A, E, beta-carotene. *J Surg Res.* 49(1):98-102, (1990).
- Greer FR. Vitamin K status of lactating mothers and their infants. *Acta Paediatr Suppl.*;88(430):95-103. (1999).
- Greene, R.M., Pratt, R.M., *Developmental Aspects of Secondary Palate Formation*, *J Embryol. Exp. Morphol.* 36, 225-245, (1976).
- Gultepe, M., Ozcan, O., Avsar, K., Cetin, M., Ozdemir, A.S., Gok, M., Urine methylmalonic acid measurements for the assessment of cobalamin deficiency related to neuropsychiatric disorders, *Clin. Chem.*, 36:275-282, (2003).

- 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).
- Hall, C.A., The proteins of transport of the cobalamins, 53-70, (1989).
- 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).
- Hazen, S.A., Waheed, A., Sly, W.S., LaNoue, K.F., Lynch, C.J., Differentiation-dependent expression of CA V and the role of carbonic anhydrase isozymes in pyruvate carboxylation in adipocytes. *FASEB Journal*, 10 (4): 481-490(1996).
- Henry, R.P., Swenson, E.R., The distribution and physiological significance of carbonic anhydrase in vertebrate gas exchange organs. *Respiration Physiology*, 121 (1): 1-12 (2000).
- Hewett-Emmett, D., and Tashian, R. E., Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  carbonic anhydrase gene families. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 5: 50-77 (1996).
- Hewett-Emmett, D., In the Carbonic Anhydrase-New Horizons. Birkhauser Verlag, Basel, 29: 78 (2000).
- Hilvo, M., Tolvanen, M., Clark, A., Shen, B.R., Shah, G.N., Waheed, A., Halmi, P., Hanninen, M., Hamalainen, J.M., Vihinen, M., Sly, W.S., Parkkila, S., Characterization of CA XV, a new GPI-Anchored form of carbonic anhydrase. *Biochemical Journal*, Part 1, 392:83-92 (2005).
- Higdon J. Health Implications and Intake Recommendations. In: *An Evidence-Based Approach to Vitamins and Minerals* New York: Thieme; (2003).
- 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).

- Hunaiti, A.A., and Soud, M., Effect of lead concentration on the level of glutathione, glutathione S-transferase, reductase and peroksidase in human blood. *The Science of The Total Environment*, 248: 45-50 (2000).
- Hunt TK, Ehrlich HP, Garcia JA, Dunphy JE. Effect of vitamin A on reversing the inhibitory effect of cortisone on healing of open wounds in animals and man. *Ann Surg.* 170(4):633-41(1969).
- Jabusch, J. R., and Deutsch, H. F., "Localization of the lysines actylated in ubiquitin reacted with p-nitrophenyl acetat", *Arch. Biochem. Biophys.*, 238: 170 (1989).
- Jacob, E., Baker, S.J., Herbert, V., Vitamin B12-binding proteins, *Physiol. Rev.*, 60:918-959, (1980).
- Janson-C., Ryden L., *Protein Purification*. New York Press., New York, 375-679(1997).
- Johansen, J.T., Isolation of human carbonic anhydrase B and C and apocarbonic anhydarse by affinity chromatography. *Carlsberg Res. Commun*, 41: 73 (1976).
- Johansson, S., Gustafson, A.L., Eriksson, U., Dencker, L., Retinoid binding proteins in mouse yolk sac and chorio-allantoic placentas, *Anat Embryol* 195, 483-490, (1997).
- Jorgensen M.,Cantor A.,Furie B.C.,Shoemaker C.,Furie B.:Recognition site directing vitamin K-dependent  $\gamma$ - carboxylation resides on the propeptide of factor IX. *Cell*,48:185-191, (1987).
- Kaiser, E. T., and Lo, K. W., "The Carbonic anhydrase catalysed hydrolysis of 2-hydroxy-5-nitrotoluen sulfonic sultane", *J. Am. Chem. Soc.*, 91: 4912 (1969).
- Kayaalp, O., *Tıbbi Farmakoloji*, 9. Baskı Cilt 2, Hacettepe TAŞ, S: 1541-1591, (2000).
- Kayadibi, H., Alkol dışı yağlı karaciğer hastalığında prolidaz enzim aktivitesi, lipojenez ve kobalamin metabolizması , uzmanlık tezi, Gülhane askeri tıp akademisi, Haydarpaşa eğitim hastanesi, İstanbul, 22-24, (2006).

- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö. “Biyokimya”,Aktif Yayınevi,Erzurum, 85-95 (2010).
- Keha, E. E., Ve Küfrevioğlu, Ö. İ., Biyokimya, Aktif Yayınevi, 642 (2010).
- Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ., Biyokimya, Muhtelif kısımlar. Şafak Yayınevi, Erzurum, (2005).
- Keha, E.E., ve Küfrevioğlu, Ö.İ., 2008. Biyokimya. Aktif Yayınevi, İstanbu ,91-118 (2008).
- 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  $\beta$ -helix revealed by the crystal structure of a carbonic anhydrase from the archaeon *Methanasarcina thermophila*. EMBO, I 15: 2323-2330 (1996).
- Kochhar, D.M., Penner, J.D., Satre, M.A., Derivation of retinoic acid and metabolites from a teratogenic dose of retinol (vitamin A) in mice, Toxicol Appl Pharmacol 96, 429-441, (1988).
- Konukoglu, D., Tus’a Hazırlık Biyokimya. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 435 (2000).
- Koolman, J., Klaus-Henrich, R., and Jürgen, W., Renkli Biyokimya Atlası, Çeviri Editörleri: Doç. Dr. Akın Yeşilkaya, Doç. Dr. Aslı Baykal, Dr Özgül Alper., Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti, (2003).
- 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).
- Kurachi K.,Davie E.W.:Isolation and characterization of cDNA coding for human factor IX. Proc . Natl.Acad.Sci.U.S.A.,79:6461-6464, (1982).
- Laemmli, D.K., Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4. Nature, 227: 680 (1970).

- Lakkis, M.M., Oshea, K.S., Tashian, R.E., Differential expression of the carbonic anhydrase genes for ca VII (Car7) and CA-RP VIII (Car8) in mouse brain. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 45 (5): 657-662 (1997).
- Langman M. Part 2 Fat soluble Vitamins: Vitamin K. In: Expert Group on Vitamins and Minerals. *Safe Upper Levels for Vitamins and Minerals* ,154-161,(2003).
- Lee KH, Tong TG. Mechanism of action of salicylates. 8. Effect of topical application of retinoic acid on wound-healing retardation action of a few antiinflammatory agents. *J Pharm Sci.* 59(7):1036-8(1970).
- Leevy, C.M., Frank, O., Leevy, C.B., Baker, H., Nutritional factors in liver disease of the alcoholic, *Acta Med. Scan.*, 703:67-79, 1985.
- Lehninger A.L., *Principles of biochemistry*. Newyork: Worth, Publishers Inc, 2011. 587-665 (2011).
- Lehninger, A.L., *Trennung von Proteinen aufgrund von spezifiscl Liganden: Affinitats-Chromatographie*. Biochemie, Verlag Chemie, 134 (1983)
- Lehninger A.L., *Principles of biochemistry*. Newyork: Worth, Publishers Inc, (2011).
- Lehtonen, J., Shen, B., Vihinen, M., Casini, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Parkkila, A.K., Saarnio, J., Kivela, A.J., Waheed, A., Sly, W.S., Parkkila, S., Characterization of CA XIII, a novel member of the carbonic anhydrase isozyme family. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 2719-2727 (2004).
- Lesburg, C. A., and Christianson, D. W., X – ray crystalllaographic 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., Coleman, J.E., "The Catalytic Mechanism of Carbonic Anhydrase", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70(9): 2505 (1973).

- Lindskog, S., Carbonic anhydrase. In *Advances in horganik Biochem*, 4. bs, 115-170 (1982).
- Lindskog, S., "Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase", *vPharmacol. Ther*, 74 (1997).
- Lindskog, S., and Silverman, D.W. , The catalytic mechanism of mammalian carbonic anhydrases. In *The Carbonic Anhydrases-New Horizons*, Chegwidde W.R., Edwards, Y., and Carter, N., Eds., Birkhäuser Verlag, Basel, 175-196 (2000).
- Lineweaver, H., Burk, D., The determination of enzyme dissociation constant. *J. Am. Chem. Soc.*, 56: 658 (1934).
- Lowe, N., Edwards, Y.H., Edwards, M., Butterworth, P.H., "Physical Mapping of the Human Carbonic Anhydrase Gene Cluster on Chromosome 8", *Genomics*, 10 (4): 882 (1991).
- Maa, J.S., Rodriguez, J.F., and Esteban, M., Structural and functional characterization of a cell surface binding protein of Vaccinia virus. *Journal of Biological Chemistry*, 265: 1569-1577 (1990).
- Maden, M., Gale, E., Kostetskii, I., Zile, M., Vitamin A deficient quail embryos have a half hind brain and other neural defects, *Curr Biol* 6, 417-426, (1996).
- 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) .
- 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 (1): 98-104 (1997).
- 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 (1993).

- Mohanty, A. K., Kannan, K.K., Mahajan S.K., "Human Carbonic Anhydrase I: Effect of Specific Site Mutations on Its Function", J. Biosci, 23 (3): 235 (1998).
- Nau, H., Chahoud, I., Dencker, L., Lammer, E.J., Scott, W.J., Teratogenicity of vitamin A and retinoids. In: Vitamin A in Health and Disease (Blomhoff R. ed.), Dekker, New York, 615-663, (1994).
- Nelsestuen GL, Zytkovicz TH, Howard JB. The mode of action of vitamin K. Identification of gamma carboxyglutamic acid as a component of prothrombin. J Biol Chem 249:6347-50, (1974).
- Nelson, D.L., and Cox, M.M., Lehninger Biyokimyanın İlkeleri, Çeviri Editörü: Prof. Dr. Nedret Kılıç, Üçüncü Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık, (2005).
- Nishimori, I., Acatalytic CAs, Carbonic anhydrase related proteins, in Carbonic Anhydrase, Its Inhibitors and Activators (Supuran, C. T., Scozzafava, A., and Conway, J., Eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, 24-43 (2004).
- O'carra, P., Barry, S., and Griffin, T., Spacer arms in affinity chromatography : the need for a more rigorous approach. Biochem.Soc.Trans, 1: 289-290 (1973).
- Okuyama, T., Waheed, A., Kusumoto, W., Zhu, X.L., Sly, W.S., Carbonic-anhydrase .4. role of removal of c-terminal domain in glycosylphosphatidylinositol anchoring and realization of enzyme-activity. Archives of Biochemistry and Biophysics, 320 (2): 315-322 (1995).
- Outi. T., Marjo. A., Sami. I., Cord blood concentrations of vitamin A in preterm infants, *Early Human Development* ,56 , 39-47, (1999).
- Özdemir, H.. Bazı Aktif Katyonların Değişik Orjinli Karbonik Anhidraz İzoenzimleri Üzerine İnhibisyon Etkilerinin Arastırılması (yüksek lisans tezi). Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, (1992).

- 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).
- Özensoy, Ö., “Eritrositlerden Karbonik Anhidraz \_zoenzimlerinin Saflaştırılması için Yeni Bir Afinite Jelinin Sentezi ve Uygulanması” Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, (2002).
- 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).
- Phillips JD, Kim CS, Fonkalsrud EW, Zeng H, Dindar H. Effects of chronic corticosteroids and vitamin A on the healing of intestinal anastomoses. *Am J Surg.* 163(1):71-7(1992)
- Philopot, F. J., and Philopot, J., “A modified colorimetric estimation of Carbonic anhydrase”, *J.Biochem.*, 30: 2191 (1936).
- Poulsen, S.A., Wilkinson, B.L., Innocenti, A., Vullo, D., Supuran, C.T., Inhibition of human mitochondrial carbonic anhydrases VA and VB with para-(4-phenyltriazole-1-yl)-benzenesulfonamide derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18: 4624-4627 (2008).
- Pocker, Y., and Sarkanen, S., Carbonic anhydrase: structure, catalytic versatility and inhibition, *advances in enzymology*. New York, 149- 273 (1979).
- Reifen R. Vitamin A as an anti-inflammatory agent *Alternative Medicine Review*, *Proc Nutr Soc* .61:397-400, (2002).
- Ren, X.L., Lindskog, S., Buffer dependence of CO<sub>2</sub> hydration catalyzed by human carbonic anhydrase-I *Biochimica et Biophysica Acta*, 1120 (1): 81-86 (1992).



- Ross, S.A., McCaffery, P.J., Drager, U.C., DeLuca, L.M., , Retinoids in Embryonal Development, *Physiol Rev* 80, 1021-1054, (2000).
- 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).
- Ryon, U.S., Whitney, P.L., and Ryen, J.W., “localization of Carbonic Anhydrase on pulmonary artery endothelial cells in culture”, *J. Appl. Physiol.*, 53: 914 (1982).
- Sarikaya S.B.Ö. , Topal F., Şenturk M., Gulçin İ., Supuran C. T., *In vitro* inhibition of a-carbonic anhydrase isozymes by some phenolic compounds. *Bioorg Med Chem Lett*, 21: 4259–4262 (2011).
- Sass, J.O., Tzimas, G., Elmazar, M.M., Nau, H., Metabolism of retinaldehyde isomers in pregnant rats: 13-cis- and all-trans-retinaldehyde, but not 9-cis-retinaldehyde, yield very similar patterns of retinoid metabolites, *Drug Metab Dispos* 27, 317 321,(1999).
- Scozzafava, A., and Supuran, C.T., *Biorganic Medicinal Chemistry Letters* 12, With permission from Elsevier, 1177–1180, (2002).
- Segel, I.H. , *Biochemical Calculations*, Inc, New York, 403 (1968).
- Semba, R.D., Muhilal Ward, B.J., Griffin, D.E., Scott, A.L., Nadatisastra, G., West, K.P., Sommer, A., Abnormal T-cell subset proportions in vitamin A deficient children, *Lancet* 341, 5-8, (1993).
- Seifter E, Crowley LV, Rettura G, Nakao K, Gruber C, Kan D. Influence of vitamin A on wound healing in rats with femoral fracture. *Ann Surg.* 181(6):836-41,( 1975).
- Senturk M., Gülçin İ., Daştan A., Küfrevioğlu Ö. İ., Supuran C. T., Carbonic anhydrase inhibitors Inhibition of human erythrocyte isozymes I and II with a series of antioxidant phenols. *Bioor Med Chem*, 17: 3207–3211 (2009).
- Simonsson, I., and Lindskog, S., The interaction of sulfate with carbonic anhydrase. *Eur. J. Biochem*, 123: 29-36, (1982).

- Sjoblom, B., Elleby, B., Wallgren, K., Jonsson, B.H., Lindskog, S., Two point mutations convert a catalytically inactive carbonic anhydrase-related protein (CARP) to an active enzyme. *FEBS Letters*, 398 (2-3): 322-325, (1996).
- Sly, W.S., Hu, P.Y., Human carbonic-anhydrases and carbonic-anhydrase deficiencies. *Annual Review of Biochemistry*, 64: 375-401 ,(1995).
- Sorrel, M.F., Baker, H., Barak, A.J., Frank, O., Release by ethanol of vitamins in rat liver perfusates, *Am. J. Clin. Nutr.*, 27:743-745, (1974).
- Sperling R.,Furie B.C.,Blumenstein M.,Keyt B.,Fruie B.:Metal binding properties of  $\gamma$ -carboxyglutamic acid.Implications for the vitamin Kdependent blood coagulation proteins.*J.Biol.Chem.*,2532:3898-3906, (1978).
- Stenflo J.: Vitamin K and the biosynthesis of prothrombin.IV. Isolation of peptides containing prosthetic groups from normal prothrombin and the corresponding peptides from dicumarol-induced prothrombin. *J.Biol. Chem.*249: 5527-5535, (1974).
- Sugrue, M. F., “The Preclinical Pharmacology of Dorzolamide hydrochloride, a Topical Carbonic Anhydrase Inhibitor”, *J. Ocular Pharmacol. Ther*, 12. bs., 363 ,(1996).
- Sugrue, M.F., Pharmacological and ocular hypotensive properties of topical carbonic anhydrase inhibitors. *Progress in Retinal and Eye Research* 19 (1): 87-112, (2000).
- Supuran, C. T., Scozzafava, A., *Eur. J. Med. Chem*, 35: 867, (2000).
- Supuran, C.T., and Scozzafava, A., Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 1.bs., 61-97 ,(2001).
- Supuran, C.T., Indisulam: An anticancer sulfonamide in clinical development. *Expert Opin Investig Drugs*, 12.bs., 283,287 ,(2003).
- Supuran, C.T., Innocenti, A., Mastrolorenzo, A., Scozzafava, A., Antiviral sulfonamide derivatives. *Mini Rev Med Chem* , 4. bs., 189-200, (2004).

- Supuran, C.T., “Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications cfor inhibitors and activators” Rev.7, February , 1: 14, (2008).
- Suttie J.W.Synthesis of vitamin K-dependent proteins.FASEB J.,7:445-452 , (1993).
- Svastova, E. , Hulikova, A. , Casini A. , Rafajova , M., Scozzafava , A. , and Supuran , C. , T. , “Hypoxia Activates the Capacity of Tumor-Associated Carbonic Anhydrase IX to Acidify Extracellular pH” , FEBS, 577: 439 ,(2004).
- Stenflo J.: Vitamin K and the biosynthesis of prothrombin.IV. Isolation of peptides containing prosthetic groups from normal prothrombin and the corresponding peptides from dicumarol-induced prothrombin. J.Biol. Chem.249: 5527-5535,(1974).
- Tekman, Ş., Öner, N., Genel Kimya, I. Cilt, Fatih yayınevi matbaası, İstanbul, 335-367 (1986).
- Thompson, J.N., Howell, J.M., Pitt, G.A.J., McLaughlin, C.I., The biological activity of retinoic acid in the domestic fowl and the effects of vitamin A deficiency on the chick embryo, Br J Nutr, 23, 471-490, (1969).
- 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).
- Tozlu, İ., Eritrositlerinden Afinite Kromatografisi ile saflaştırılan Karbonik Anhidraz Enziminin Kinetik Ve Elektroforetik Özelliklerinin \_ncelenmesi (Yüksek Lisans Tezi). Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilimdalı, Van, (1997).
- Türeci, O., Sahin, U., Vollmar, E., et al. “Human Carbonic anhydrase XII: cDNA Cloning, Expression and Chromosomal Localization of a Carbonic Anhydrase Gene that is Overexpressed in Some Renal Cell Cancers” Proc. \_atl Acad. Sci. USA, 95: 7608, (1998).
- Ümit, G., Sıvır Plazmasındaki K vitaminine bağımlı proteinlerin iki boyutlu elektroforez ile ayrılması, Yüksek Lisans Tezi, *Sağlık bilimleri enstitüsü*, İstanbul, 5:7, (2006).

- Verpoorte, J.A., Mehta, S., and Edsall, J.T., Esterase activities of human carbonic anhydrase. *J.Biol. Chem*, 242: 4221, (1967).
- Warburg, O., and Christian, W., "Isolierung und Kristallization des Gärungsferuient Enolase". *Biochem.* 310- 384, (1941).
- Wellik, D.M., DeLuca, H.F., Retinol in addition to retinoic acid is required for successful gestation in vitamin A deficient rats, *Biol Reprod* 53, 1392-1397, (1995).
- Whitney, P.I., Affinity chromatography of carbonic anhydrase. *Anal. Biochem*, 64: 267, (1974)
- Wiedermann U, Chen XJ, Enerbäck L, Hanson LA, Kahu H, Dahlgren UI. Vitamin A deficiency increases inflammatory responses. *Scand J Immunol.* 44(6):578-84,(1996).
- Wilbur, K.M., and Anderson, N.G.,. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase, *Journal of Biological Chemistry*, 176: 147-154, (1948).
- Supuran, C., T., "Carbonic Anhydrase Inhibitors: Synthesis and Inhibition of Cytosolic/tumor-associated Carbonic Anhydrase Isozymes I, II, IX, V and XII with N-hydroxysulfomides a New Zinc-Binding Function In the Desing Inhibitors" Elsevier Science, 15: 2353 (2005).
- Winum, J., Y., Innocenti, A., Montero, J., L., Scozzafava, A., Vulloa, D., Gagnard, V., and Supuran, C., T., "Carbonic Anhydrase Inhibitors. Interaction of Isozymes I, II, IV, V and IX with Organic Phosphates and Phosphonates" Elsevier Science, 15: 1683, (2005).
- Wistrand, P.J., Lindahl, S. and Wahlstrand, T., Human renal carbonic anhydrase. Purification and properties. *Eur. J. Biochem.*, 57: 189, (1975).
- 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 Anhydrase B and C for the Unloading of CO<sub>2</sub> by the Human Erythrocyte", *Acta Physiol. Scand.*, 343 ,(1981).

Zimmerman, S. A., Ferry, J.G., Supuran, C.T., "Inhibition of the Archaeal Beta- Class (Cab) and Gamma-Class (Cam) Carbonic Anhydrases." *Curr Top Med. Chem.*, 7 (9): 901, (2007).

Zipursky A. Prevention of vitamin K deficiency bleeding in newborns. *Br J Haematol.* 104(3):430-7, (1999).

## ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Ankaranın Şereflikoçhisar ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Şereflikoçhisarda ve lise öğrenimini Ankarada tamamladıktan sonra 1999 yılında Atatürk Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Bölümünden mezun oldu. 2004 yılında dersane öğretmenliğine başladı. 2009 yılında Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Kimya A.B.D.'a yüksek lisansa başladı.