

T.C.

**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**MANYETİK ALANIN İNSAN ERİTROSİT KARBONİK ANHİDRAZ
İZOENZİMLERİ (hCA-I VE hCA-II) ÜZERİNE İN VİTRO ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEMA COŞKUN

Balıkesir, Eylül 2007

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

MANYETİK ALANIN İNSAN ERİTROSİT KARBONİK ANHİDRAZ
İZOENZİMLERİ (hCA-I VE hCA-II) ÜZERİNE *IN VITRO* ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEMA COŞKUN

Tez Danışman: Prof. Dr. Oktay ARSLAN

İkinci Danışman: Doç. Dr. Hakan KÖÇKAR

Sınav Tarihi: 28.08.2007

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Oktay ARSLAN (Danışman)(BAÜ)

Prof. Dr. Mahir ALKAN (BAÜ)

Doç. Dr. Feray KÖÇKAR (BAÜ)

Doç. Dr. Yusuf TURAN (BAÜ)

Yr. Doç. Dr. Selma SİNAN (BAÜ)

Balıkesir, Eylül 2007

ÖZET

MANYETİK ALANIN İNSAN ERİTROSİT KARBONİK ANHİDRAZ İZOENZİMLERİ (HCA I VE HCA II) ÜZERİNE İN VİTRO ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sema COŞKUN

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı

(Yüksek Lisans tezi / Tez Danışmanı : Prof. Dr. Oktay ARSLAN)

Yardımcı Danışman: Doç. Dr. Hakan KÖÇKAR

Balıkesir, 2007

Bu çalışmada, manyetik alanın (H), karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA-I ve hCA-II) üzerinde in vitro etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla kullanılan hCA-I ve hCA-II izoenzimleri Sepharose-4B-L-trozin-p-aminobenzen-sülfonamid kimyasal yapısına sahip afinite kolonu kullanılarak insan eritrositlerinden saflaştırılmıştır. İzoenzimlerin saflığı, Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) ile kontrol edilmiştir.

Manyetik alanın saflaştırılmış enzimler üzerindeki etkilerinin araştırılması amacı ile farklı şiddetlerde ve farklı zaman aralıklarında manyetik alana maruz bırakılan enzimlerin aktivite ölçümleri yapılmıştır. Her iki izoenziminde belirli oranda manyetik alandan etkilendiği saptanmıştır. Ayrıca, manyetik alanın farklı pH ve farklı iyonik şiddetteki enzim aktivitelerini nasıl etkilediği bulunmuştur. Son olarak manyetik alan altında sülfonilamid ve perklorat bileşiklerinin inhibisyon etkisi saptanmıştır.

Anahtar sözcükler : hCA-I, hCA-II, manyetik alan, in vitro, saflaştırma

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF EFFECTS OF MAGNETIC FIELD ON HUMAN ERYTHROCYTES CARBONIC ANHYDRASE ISOENZYMES IN VITRO

Sema COŞKUN

**Balıkesir University, Institute of Science, Department of Chemistry
(Thesis / Supervisor: Prof.Dr.Oktay ARSLAN)
Co Supervisor : Doç.Dr. Hakan KÖÇKAR**

Balıkesir-Turkey, 2007

In this study, the effect of magnetic field on carbonic anhydrase isoenzyme in vitro was determined. Carbonic anhydrase was purified with affinity chromatography from human erythrocyte. With this aim, the gel was synthesized with Sepharose-4B-L-tyrosine and p- aminobenzosulfonamide as an affinity ligand by ourself.

The main aim of this study is to investigate the effect of magnetic field on purified iso-enzymes. Therefore, the activities of iso-enzymes subjected to the various magnetic field intensity and time intervals were measured, respectively. It is found that the enzymes studied in this investigations were found to be affected by magnetic field in terms of both the magnetic field intensity and the time intervals, respectively. Furthermore, It is seen how the solution pH and the ionic intensity affected the activities of enzymes, respectively. Finally, the influence of inhibitions on sulphonilamide and perchlarate were determined.

Key words : hCAI, hCAII, magnetic field, in vitro, purification

İÇİNDEKİLER	<u>Sayfa</u>
ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER	ii
ABSTRACT, KEY WORD	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SEMBOL LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
ÇİZELGE LİSTESİ	xiii
ÖNSÖZ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Karbonik Anhidraz Enzimi	2
1.1.1. Sınıflandırılması, Dağılımı ve Fizyolojik Önemi	2
1.1.2. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar	3
1.1.3 Karbonik Anhidraz Enziminin Üç Boyutlu Yapıları	3
1.1.4. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması	5
1.1.5. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri	7
1.1.6. Karbonik Anhidraz İzoenzimleri	8
1.1.7. Karbonik Anhidraz Enziminin Hastalıklar ile İlişkisi	10
1.2. Protein Saflaştırma Teknikleri	11
1.2.1. Afinite Kromatografisi	11
1.2.2. Karbonik Anhidraz Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması	12
1.3. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayin Yöntemleri	13
1.3.1. CO ₂ -Hidrataz Aktivitesi	13
1.3.2. Esteraz Aktivitesi	14
1.4.1. Manyetik Alan	14
1.4.1. Manyetizmanın Temel Kavramları	15

1.4.1.1. Diamanyetizma	16
1.4.1.2. Paramanyetizma	17
1.4.1.3. Ferromanyetizma	18
2. MATERYAL VE METOD	19
2.1. MATERYAL	19
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	19
2.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	19
2.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	20
2.1.3.1. Sepharose 4B Jel Sentezinde Kullanılan Yıkama Tamponu	20
2.1.3.2. Sepharose 4-B Jel Sentezinde Kullanılan Saklama Tamponu	20
2.1.3.3. Afinitive Jeli Dengeleme Tamponu	20
2.1.3.4.(Hemolizat Tatbikinden Sonra) Afinitive Jeli Yıkama Tamponu	20
2.1.3.5. hCA Elüsyon Tamponu	21
2.1.3.6. CO ₂ - Hidrataz Aktivite Tamponu	21
2.1.3.7. CO ₂ - Hidrataz Aktivitesi Tamponu	21
2.1.3.8. CO ₂ -Hidrataz Aktivitesi CO ₂ çözeltisi	21
2.1.3.9.SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponu	21
2.1.3.10. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan tank tamponu	22
2.1.3.11. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı	22
2.1.3.12. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi	22
2.1.3.13. SDS-PAGE elktroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi	22
2.1.3.14. SDS-PAGE Eloktroforezi:Numune Tamponu	22
2.2. YÖNTEMLER	24

2.2.1. Afinite Jelinin Hazırlanması	24
2.2.1.1. Sepharose 4B'nin Aktifleştirilmesi ve L-Tirozinin kolona eklenmesi	24
2.2.1.2. Sülfonamidin Kenetlenmesi	25
2.2.2. Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin (hCA I ve hCA II) Saflaştırılması	26
2.2.2.1. Kan Numunelerinin Alınması ve Hemolizatın Hazırlanması	26
2.2.2.2. Hemolizatın Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enziminin Elüsyonu	27
2.2.2.3. Karbonik Anhidraz Aktivite Tayini (CO ₂ -Hidrataz Aktivitesi)	27
2.2.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) İle Enzim Saflığının Kontrolü	28
2.2.4. Titreşimli Örnek Magnetometresi (VSM) ile örneklerin manyetik özelliklerinin belirlenmesi	29
2.2.5. Manyetik alanın izoenzimler üzerindeki etkisi	32
2.2.5.1 .Manyetik Alan Ölçüm Sistemi	32
2.2.5.2.Sabit manyetik alanda farklı sürelerde, manyetik alanın izoenzimler üzerindeki etkisi	33
2.2.5.3 Farklı şiddette ve sabit zaman aralıklarında, manyetik alanın izoenzimler üzerindeki etkisi	34
2.2.5.4.Sabit manyetik alanın farklı pH'larda izoenziler üzerindeki etkisi	34
2.2.5.5 Sabit manyetik alanın farklı iyonik şiddetlerdeki izoenzimler üzerine etkisi	34
2.2.5.6. Sabit manyetik alanın inhibitör içeren izoenzimler üzerindeki etkisi	35
3. BULGULAR	36
3.1. Afinite Kromatografisi İle hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerin Saflaştırılması	36
3.2. hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerinin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi	37
3.3. hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerin Aktivite Tayini	37
3.4. İzoenzimlerin ve kullanılan çözeltilerin manyetik özelliklerinin belirlenmesi	38

3.5. Manyetik alanın izoenzimler üzerindeki etkisi	53
3.5.1. Sabit manyetik alanın izoenzimler üzerindeki etkisi	53
3.5.2. Farklı şiddetteki manyetik alanın izoenzimler üzerindeki etkisi	56
3.5.3. Sabit manyetik alanın farklı pH'larda izoenziler üzerindeki etkisi	58
3.5.4. Sabit manyetik alanın farklı iyonik şiddetlerdeki izoenzimler üzerine etkisi	61
3.5.5. Sabit manyetik alanın inhibitör içeren izoenzimler üzerindeki etkisi	63
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	67
5.KAYNAKLAR	72

SEMBOL LİSTESİ

Simge

CA

CNBr

E.C.

hCAI

hCAII

IOP

PAGE

SDS

U

H

M

Adı

Karbonik anhidraz enzimi

Siyanojen bromür

Enzim kod numarası

İnsan karbonik anhidraz İzoenzim I

İnsan karbonik anhidraz İzoenzim II

Yüksek göz içi basıncı

Poliakrilamid jel elektroforezi

Sodium dodesi sülfat

Enzim Ünitesi

Manyetik alan şiddeti

Manyetizasyon vektörü

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1	Karbonik anhidraz izoenzimlerinin katalitik bölgeleri	5
Şekil 1.2	CA enziminin CO ₂ -hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik gösterilişi	6
Şekil 1.3	Afinite kromatografisinin şematik gösterili	12
Şekil 1.4	Diamanyetizma	16
Şekil 2.1	Sepharose 4B'nin aktifleştirilmesi	25
Şekil 2.2	L-tirozinin Bağlanması	25
Şekil 2.3	Sülfonilamid Bileşiğinin Bağlanması	26
Şekil 2.4	VSM'in şematik gösterimi	31
Şekil 2.5	Manyetik alan ölçüm sistemi	33
Şekil 3.1	hCA-I ve hCA-II enziminin elüsyon grafiği	36
Şekil 3.2	Afinite kromatografisi ile saflaştırılan hCA-I ve hCA-II enzimlerinin SDS- PAGE görüntüleri	37
Şekil 3.3	Saf suyun VSM ile manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi	39
Şekil 3.4	Tris-SO ₄ çözeltisinin VSM ile manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi	39
Şekil 3.5	hCA-I izoenzimin VSM ile manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi	40
Şekil 3.6	pH:6 ortamındaki hCA-I izoenzimin VSM ile manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi	40
Şekil 3.7	pH:7 ortamındaki hCA-I izoenzimin VSM ile manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi	41
Şekil 3.8	pH:8 ortamındaki hCA-I izoenzimin VSM ile manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi	41
Şekil 3.9	pH:9 ortamındaki hCA-I izoenzimin VSM ile manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi	42

Şekil 3.10	hCA-II izoenzimin VSM ile manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi	42
Şekil 3.11	pH:6 ortamındaki hCA-II izoenzimin VSM ile manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi	43
Şekil 3.12	pH:7 ortamındaki hCA-II izoenzimin VSM ile manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi	43
Şekil 3.13	pH:8 ortamındaki hCA-II izoenzimin VSM ile manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi	44
Şekil 3.14	pH:9 ortamındaki hCA-II izoenzimin VSM ile manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi	44
Şekil 3.15	0.05 M Na ₂ SO ₄ içeren çözelti ortamındaki hCA-I izoenziminin manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi	45
Şekil 3.16	0.1 M Na ₂ SO ₄ içeren çözelti ortamındaki hCA-I izoenziminin manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi	45
Şekil 3.17	0.15 M Na ₂ SO ₄ içeren çözelti ortamındaki hCA-I izoenziminin manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi	46
Şekil 3.18	0.2 M Na ₂ SO ₄ içeren çözelti ortamındaki hCA-I izoenziminin manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi	46
Şekil 3.19	0.25 M Na ₂ SO ₄ içeren çözelti ortamındaki hCA-I izoenziminin manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi	47
Şekil 3.20	0.05 M Na ₂ SO ₄ içeren çözelti ortamındaki hCA-II izoenziminin manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi	47
Şekil 3.21	0.1 M Na ₂ SO ₄ içeren çözelti ortamındaki hCA-II izoenziminin manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi	48
Şekil 3.22	0.15 M Na ₂ SO ₄ içeren çözelti ortamındaki hCA-II izoenziminin manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi	48
Şekil 3.23	0.2 M Na ₂ SO ₄ içeren çözelti ortamındaki hCA-II izoenziminin manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi	49
Şekil 3.24	0.25 M Na ₂ SO ₄ içeren çözelti ortamındaki hCA-II izoenziminin manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi	49
Şekil 3.25	Perklorat içeren çözelti ortamındaki hCA-I	

	izoenziminin manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi	50
Şekil 3.26	Sülfonilamid içeren çözelti ortamındaki hCA-I izoenziminin manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi	50
Şekil 3.27	Perklorat içeren çözelti ortamındaki hCA-II izoenziminin manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi	51
Şekil 3.28	Sülfonilamid içeren çözelti ortamındaki hCA-II izoenziminin manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi	51
Şekil.3.29	10000 Oe manyetik alan şiddetine maruz bırakılmış hCA-I izoenzimi ve kontrol grubu aktivitelerinin zamana bağlı değişimi	55
Şekil 3.30	10000 Oe manyetik alan şiddetine maruz bırakılmış hCA-II izoenzimi ve kontrol grubu aktivitelerinin zamana bağlı değişimi.	55
Şekil 3.31	Farklı manyetik alan şiddetlerine maruz bırakılmış hCA-I izoenzimi ve kontrol grubunun aktivitelerindeki 1 saat içerisinde gözlenen değişim	56
Şekil 3.32	Farklı manyetik alan şiddetlerine maruz bırakılmış hCA-II izoenzimi ve kontrol grubunun aktivitelerindeki 1 saat içerisinde gözlenen değişim	58
Şekil 3.33	10000 Oe manyetik alan şiddetine maruz bırakılmış farklı pH'lardaki hCA-I ve kontrol grubunun aktivitelerindeki 1 saatlik değişim.	60
Şekil 3.34	10000 Oe manyetik alan şiddetine maruz bırakılmış farklı pH'lardaki hCA-II ve kontrol grubunun aktivitelerindeki 1 saatlik değişim.	60
Şekil 3.35	10000 Oe manyetik alan şiddetine maruz bırakılmış farklı iyonik şiddet içeren hCA-I ve kontrol grubunun aktivitelerinin 1 saat sonundaki değişimi	62
Şekil 3.36	10000 Oe manyetik alan şiddetine maruz bırakılmış farklı iyonik şiddet içeren hCA-II ve kontrol grubunun aktivitelerinin 1 saat sonundaki değişimi	62
Şekil 3.37	10000 Oe manyetik alan şiddetine maruz bırakılmış sülfonamid içeren hCA-I ve kontrol grubunun aktivitelerindeki 1 saatlik değişim	65

Şekil 3.38	10000 Oe manyetik alan şiddetine maruz bırakılmış perklorat içeren hCA-I ve kontrol grubunun aktivitelerindeki 1 saatlik değişim	65
Şekil 3.39	10000 Oe manyetik alan şiddetine maruz bırakılmış sülfonamid içeren hCA-II ve kontrol grubunun aktivitelerindeki 1 saatlik değişim.	66
Şekil 3.40	10000 Oe manyetik alan şiddetine maruz bırakılmış perklorat içeren hCA-II ve kontrol grubunun aktivitelerindeki 1 saatlik değişimi.	66
Şekil 4.1	Sülfonamidlerin karbonik anhidraz enzimine bağlanması	70

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1	Karbonik Anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyonlar	3
Çizelge 1.2	α -CA'lar, CO ₂ hidratasyon aktiviteleri ve sülfonamide olan ilgileri	8
Çizelge 1.3	Karbonik anhidraz izoenzimleri	10
Çizelge 2.1	SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları.	23
Çizelge.3.1.	Örneklerin kütleli manyetik alınganlıkları	52
Çizelge 3.2	10000 Oe manyetik alan şiddetine farklı zaman aralıklarında maruz bırakılmış hCA-I, hCA-II izoenzimleri ve kontrol grubu aktiviteleri	54
Çizelge 3.3	Farklı manyetik alan şiddetlerine maruz bırakılmış hCA-I, hCA II izoenzimleri ve kontrol grubunun 1 saat sonundaki aktiviteleri.	57
Çizelge 3.4	10000 Oe manyetik alan şiddetine maruz bırakılmış farklı pH'lardaki hCA-I, hCA-II ve kontrol grubunun 1 saat sonundaki aktiviteleri.	59
Çizelge 3.5	10000 Oe manyetik alan şiddetine maruz bırakılmış hCA-I, hCA-II izoenzimleri ve kontrol grubunun farklı iyon konsantrasyonlarında 1 saat sonraki aktiviteleri.	61
Çizelge 3.6	10000 Oe manyetik alan şiddetine maruz bırakılmış sülfonamid içeren hCA-I, hCA-II ve kontrol grubunun 1 saat sonundaki aktiviteleri	63
Çizelge 3.7	10000 Oe manyetik alan şiddetine maruz bırakılmış perklorat içeren hCA-I, hCA-II ve kontrol grubunun 1 saat sonundaki aktiviteleri.	64

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı, Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi Biyoloji ve Kimya laboratuvarlarında, Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi ve dekanı Prof. Dr. Oktay ARSLAN ve Doç.Dr. Hakan KÖÇKAR yönetiminde gerçekleştirilmiştir

Bu çalışmanın tamamlanmasında engin bilgilerinden faydalandığım, her türlü desteği ile yanımda olan, bilgi ve tecrübelerini kendime örnek aldığım çok değerli danışman hocalarım Prof. Dr. Oktay ARSLAN' a ve Doç.Dr. Hakan KÖÇKAR'a en derin minnet ve saygılarımı arz ederim.

Çalışmalarında yardımlarını benden esirgemeyen her zaman desteğini hissettiğim sayın hocam Yr.Doç.Dr. Selma SİNAN' a en derin saygılarımı sunarım.

Çalışmalarında yardımlarını gördüğüm ve her konuda desteklerini esirgemeyen kimya bölümü Arş. Gör. Nahit GENÇER' e, Arş. Gör. Serap BEYAZTAŞ' a ve fizik bölümü Arş. Gör. Öznur KARAAĞAÇ' a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Beni bugünlere getiren, her türlü maddi ve manevi desteklerini üzerimde hissettiğim, beni benden çok düşünen canım annem, babam ve sevgili abime en içten sevgilerimi sunarım. İyi ki varsınız.

Balıkesir, 2007

Sema COŞKUN

1. GİRİŞ

Organizmada temel görevi asid-baz dengesini düzenlemek olan karbonik anhidraz Zn^{+2} iyonu içeren bir metaloenzimdir. Memelilerde α -CA ailesine bağılı aktif olan 14 karbonik anhidraz izoenzimi bulunmaktadır. Karbonik anhidraz izoenzimleri hücresele dağılımları, kinetik özellikleri ve inhibisyon profilleri açısından farklılık göstermektedirler. Ayrıca CA izoenzimlerinin doku dağılımları da farklılık göstermektedir [1-13].

Aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonu bulunduran karbonik anhidraz enzimi, canlılarda CO_2 molekülünün hidratasyonunu ve HCO_3^- iyonunun dehidratasyonunu katalizler. Karbonik Anhidraz enzimi, genel olarak metabolik CO_2 transportunu sağlamanın yanı sıra, birçok dokuda H^+ ve HCO_3^- birikiminde de rol oynamaktadır. Böylece vücuttaki birçok dokuda H^+ ve HCO_3^- iyonlarının birikimini sağlayarak, vücut sıvılarının dengelerinin kurulmasında da önemli rolü vardır [1, 14-16].

hCA-I ve hCA-II, eritrositlerde bulunan ve kanda yukarıda belirtilen fizyolojik fonksiyonları yerine getiren karbonik anhidraz izoenzimleridir. Ayrıca hCA-II izoenziminin gözdeki önemi, glaucoma hastalığı tedavisi için yapılan araştırmalar sonucu ortaya çıkarılmıştır [17].

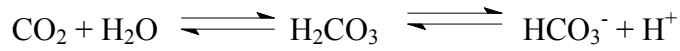
Gelişen teknoloji ile paralel olarak artan yapay manyetik alan, yeryüzü doğal manyetik alan dengesini bozmaktadır. Yüksek gerilim hatlarından, mikrodalga cihazlarından, bilgisayar ekranlarından, yapay uydulardan, cep telefonlarından ve diğer elektrikli aletlerden yayılan dalgalar, elektromanyetik kirliliğe yol açmaktadır. Bu etkenler organizmanın dengesi bozmaktadır. Bu nedenle manyetik alanın canlı organizmaları ve dolayısıyla biyomolekülleri nasıl etkilediği son yılların en popüler konularından birisi olmuştur. Bu amaçla, çok sayıda enzimin aktivitesi üzerine manyetik alanın etkisi incelenmiş ve oldukça ilginç sonuçlar elde edilmiştir.

Yukarıda belirtildiği gibi organizmada son derece önemli fizyolojik özelliğe sahip karbonik anhidraz izoenzimlerinin üzerinde manyetik alanın etkisi hakkında literatürde herhangi bir bulguya rastlanmamıştır. Bu amaçla insan eritrositlerden afinite kromatografisi ile saflaştırılan hCA-I ve hCA-II izoenzimleri üzerinde manyetik alanın etkisinin araştırılması planlanmıştır. Elde edilecek sonuçların, literatürdeki bu önemli bilgi eksikliğini tamamlamasının yanı sıra insan sağlığı açısından da önemli olacağı kanısındayız.

1.1.Karbonik Anhidraz Enzimi

1.1.1 Sınıflandırılması, Dağılımı ve Fizyolojik Önemi

Karbonik anhidraz (Karbonat Hidroliyaz E.C.4.2.1.1), bütün organizmalarda bulunan Zn^{+2} iyonlu bir metaloenzimdir. İlk olarak, sığır eritrositlerinde keşfedilen karbonik anhidraz, canlılarda CO_2 molekülünün hidratasyonunu ve HCO_3^- iyonunun dehidratasyonunu katalizleyen bir enzimdir [1, 2].



Karbonik Anhidraz enzimi, genel olarak metabolik CO_2 transportunu sağlamanın yanı sıra, birçok dokuda H^+ ve HCO_3^- birikiminde de rol oynamaktadır. Bu dokular arasında böbrek, gastrik mukoza ve göz lensini sayabiliriz. Bunlardan başka histokimyasal metodlarla tükrük bezleri, kaslar, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokularında da CA'ya rastlanmıştır. Balıkların solungaç ve salgı organlarında bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında, alglerde ve bitkilerin fotosentetik hücre kloroplastlarında bu enzimin değişik rolleri olduğu ayrıca ispatlanmıştır [1, 14-16].

Karbonik anhidrazın değişik izoenzimleri farklı dokulara dağılmış olarak bulunur. Bazı izoenzimler aynı dokuda birlikte bulunduğu gibi (eritrosit hCA-I ve hCA-II), diğer bazı dokularda tek bir izoenzim bulunmaktadır (membrana bağlı CA-IV).

1.1.2 Karbonik Anhidraz Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar

Karbonik anhidraz CO₂ molekülünün hidratasyonu reaksiyonunun yanı sıra, siyanatın karbamik aside veya ürenin siyamide, aldehidin geminal diol hidratasyon reaksiyonlarını da katalizlemektedir. Karboksilik, sülfonik ve fosforik asit esterlerinin hidrolizleri de bu enzim tarafından katalizlenmektedir. Ancak CA enziminin hidrataz aktivitesi dışında, Çizelge1.1’de gösterildiği gibi elektrofilik bir merkeze, nükleofilik atakları içeren, aldehit, pirüvat, ve alkil piruvatların hidratasyonu, pirüvik sülfonik ve fosforik esterlerinin hidrolizi gibi reaksiyonlarını da katalizlemektedir. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesini ortaya koyan bu özelliği ile, organizmada fizyolojik bir rolü olup olmadığı henüz bilinmemektedir. [18, 19]

Çizelge1.1 Karbonik Anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyonlar

(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)	$PhCH_2OCOC l + H_2O \rightleftharpoons PhCH_2OH + CO_2 + HCl$
(10)	$RSO_2Cl + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + HCl$ (R=Me;Ph)

1.1.3 Karbonik Anhidraz Enziminin Üç Boyutlu Yapıları

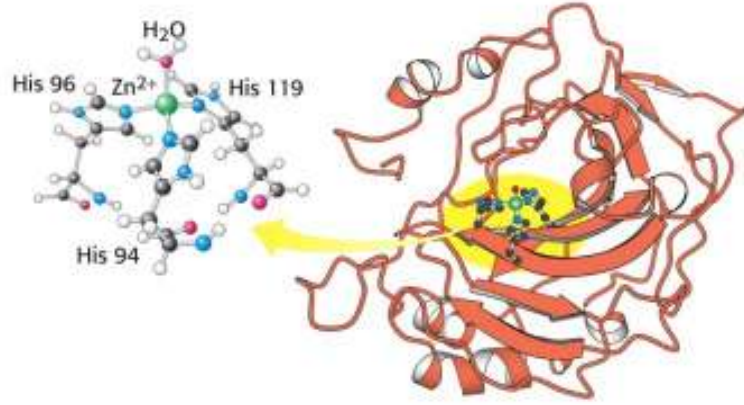
Karbonik anhidraz izoenzimlerinin üç boyutlu yapılarında büyük farklılıklar gözlenmektedir. İzoenzimlerinin üç boyutlu yapılarındaki farkın çok belirgin olmasına karşın, aktif bölgelerindeki katalitik grupların hemen hemen aynı olması dikkat çekicidir. Şekil 1.2’te gösterildiği gibi, her bir izoenzimin 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 [4, 16, 20, 21].

İnsan eritrosit CA-I ve CA-II izoenzimlerinin aminoasit dizilişlerinin tespiti, bu konudaki çalışmaların başlangıcı olmuştur. Daha sonraki yıllarda sığır, at, şempanze ve rhesus maymunlarına ait CA-I izoenzimleri ve yine sığır, at, koyun ve tavşan kaynaklı CA-II izoenzimlerinin amino asit dizilişleri tam olarak tayin edilmiştir. Kas izoenzimi olarak da bilinen CA-III izoenziminin amino asit dizilişi ise, insan için belirlendiği gibi sığır ve atlarda da araştırılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda, üç izoenzimin amino asit dizilişleri ve üç boyutlu yapıları yönünden büyük ölçüde benzerliğe sahip olduğu gösterilmiştir [22, 23].

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 [24, 25].

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin memelilerdeki molekül ağırlıkları, 28.000 dalton, bitki kloroplastlarından elde edilen ve hegzamerik bir yapıya sahip olan CA'nın ise 180.000 dalton olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, insan böbreğinde hücre zarına bağlı 66.000 dalton molekül ağırlığında ve yine tavşan eritrositlerinde 54.000 dalton molekül ağırlığında, karbonik anhidraz aktivitesine sahip proteinlere rastlanmıştır [26, 27].



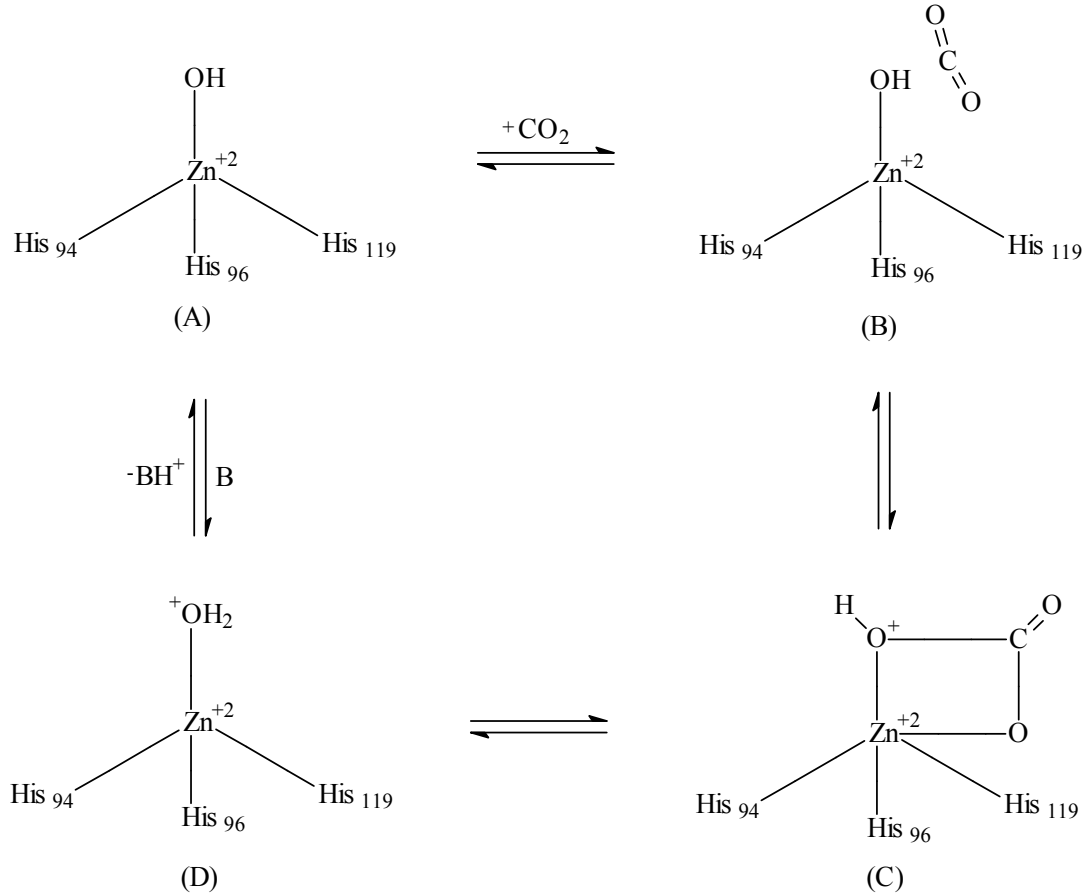
Şekil 1.1. Karbonik anhidraz izoenzimlerinin katalitik bölgeleri (His 94, His 96, His 119) [28]

1.1.4 Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması

Son 20 yıldır CA enzimini katalitik mekanizmasını aydınlatmayı amaçlayan çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarla elde edilen sonuçlara göre, CA enziminin metabolizmada son derece önemli görevleri olması, 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 amino asitler, proton verici ve proton gradienti oluşturacak şekilde düzenlenmiştir.

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 \AA derinliğindeki bir yarığın tabanında olduğunu 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 nükleofilitesini arttırmakta ve molekül nükleofilik atak

için uygun yerdeki CO_2 ' e doğru hareket etmektedir [1]. Zn^{+2} iyonuna hidroksil grubunun bağlanmasıyla enzimin aktif formu oluşur (Şekil 1.3-A). Enzimin aktif formu, güçlü nükleofilik yapısıyla CO_2 molekülüne saldırır (Şekil 1.3-B). Bu da, Zn^{+2} iyonuna bağlanmış bikarbonat iyonunun oluşmasını sağlar (Şekil 1.3-C). Daha sonra, HCO_3^- iyonu bir su molekülüyle yer değiştirir ve çözeltiye geçer. Bunun sonucunda, Zn^{+2} iyonuna su molekülü bağlanır ve bu da Şekil 1.3-D 'de görüldüğü gibi enzimin asit formuna dönüşmesini sağlar [29].

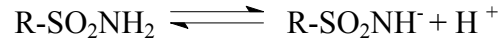


Şekil 1.2. CA enziminin CO_2 -hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik gösterilişi [4].

1.1.5 Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

İki ana karbonik anhidraz inhibitör sınıfı bulunmaktadır; metalle kompleks yapan anyonlar ve aromatik-heteroaromatik sülfonamidlerdir [30].

Karbonik anhidrazın en güçlü inhibitörleri aromatik ve heteroaromatik sülfonamidlerdir. Sülfonamidler R-SO₂NH₂ kimyasal yapısına sahiptir. Bu formüldeki R grubu, genellikle aromatik veya heteroaromatik halka sistemidir. Sülfonamidlerin en çarpıcı özelliklerinden birisi:



denklemine göre kolaylıkla iyonik yapı kazanmaktadırlar. Bu özelliği, CA enzimi üzerine inhibisyon etkisi için son derece önemlidir. Sülfonamidlerin bu hidrofilik bölgesine ilaveten, aromatik ve heteroaromatik hidrofobik bölgelere sahiptir. Sülfonamidlerin enzimle etkileşmesi, öncelikle R-SO₂NH⁻ bileşiğindeki N atomunun CA enziminin aktif bölgesinde bulunan Zn⁺² ile iyonik bağlanması ile olurken, ikinci olarak da hidrofobik etkileşmelerle inhibitörün enzime bağlanması ile bu etkileşme tamamlanmış olur [31, 32].

Karbonik anhidraz izoenzimleri katalitik aktivitelerindeki farklılıkları gibi inhibitörlere olan ilgileride farklılık göstermektedir (Çizelge 1.2.). Hastalıkların tedavi ve teşhisinde, CA inhibitörlerinin önemi, Glaucoma hastalığı tedavisi için CA enzimi üzerinde yapılan inhibisyon çalışmalarıyla ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmalarda, CA enziminin kataliz mekanizmalarının aydınlatılmasının yanı sıra, bu enzimin dokulara dağılımı ve bu dokulardaki hayati fonksiyonları anlaşılmış, bunun sonucunda da CA enziminin inhibitörleri ve aktivatörlerinin sentezlenmesine hız verilmiştir. Bu çalışmalarda çok çeşitli CA enzimi inhibitörleri sentezlenmiş ve bu inhibitörler başta Glaucoma tedavisinde ilaç, antitümör, ağrı kesici, epilepsi ve nörolojik rahatsızlıklarda ilaç, pozitron emisyon tomografisi (PET) ve manyetik rezonans (MRI) belirlenmesinde diagnostik teşhis materyali, antiülser, diüretik ilaçların geliştirilmesinde yol gösterici olarak kullanılmaktadır. Bu sebeple, CA enziminin inhibisyon mekanizmasının bilinmesi ve yeni bileşiklerin sentezlenmesi çok büyük

önem kazanmıştır. Farklı CA izoenzimlerinin aktivitelerinin temel prosesinin anlaşılması, yeni ilaçların ve tedavi araçlarının geliştirilmesine fırsat vermektedir [33, 34].

Çizelge 1.2 α -CA'lar, CO₂ hidratasyon aktiviteleri ve sülfonamide olan ilgileri [33].

Izoform	Katalitik Aktivite	Sülfonamide İlgisi
CA I	Düşük-Orta	Orta
CA II	Yüksek	Çok Yüksek
CA III	Çok Düşük	Çok Düşük
CA IV	Yüksek	Yüksek
CA VA	Orta	Yüksek
CA VB	Yüksek	Yüksek
CA VI	Orta	Orta-Düşük
CA VII	Yüksek	Çok Yüksek
CA IX	Yüksek	Yüksek
CA XII	Düşük-Orta	Yüksek
CA XIII	Düşük-Orta(fare)	Yüksek
CA XIV	Düşük(İnsan) / Yüksek(Fare)	Yüksek (İnsan)

1.1.6 Karbonik Anhidraz İzoenzimleri

İnsanları da içine alan yüksek yapılı omurgalıların çok farklı doku ve hücrelerine yerleşmiş 14 farklı CA izoenzimi tespit edilmiş ve bağlı olduğu proteinlere göre belirlenmiştir. Bu dokuların çoğundan CA enzimi karakterize edilmiş ve fonksiyonları belirlenmeye çalışılmıştır. Bu yolla çeşitli doku ve organlarda elektrolit salgılanması, CO₂ ve pH dengesinin sağlanması, akciğer ve dokular arasındaki CO₂ /HCO₃⁻ transportu gibi fizyolojik olaylarda rol almalarının yanı sıra patolojik ve fizyolojik işlem ve olaylarda da rol aldıkları açıklanmıştır [35, 36].

Temel olarak bu izoenzimler, sitozolik formda (CA-I,CA-II,CA-VII) ve membrana bağlı (CA-IV,CA-XII,CA-XIV) olarak bulunmuştur. CA-VI bir salgı

enzimi ve CA-V izoenziminin ise bir mitokondrial enzim olduğu tespit edilmiştir [1, 14, 23, 37].

Eritrosit CA'sının en önemli fonksiyonu, doku kılcallarında metabolizma ürünü olan CO_2 , H_2CO_3 'e akciğer pulmoner kapilerde ise H_2CO_3 'in CO_2 'e dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyip, solunum olayında yer almasıdır. Böbrek tubullerinde ise aynı reaksiyonlarla Na^+ ve H_2O geri emilimini sağlamak için ya CO_2 tranferini ya da H^+ iyonu birikimini sağlar. Bu dönüşüm reaksiyonları, omurgalıların kan ve hücreler arası sıvılardaki en önemli tampon sisteminin bikarbonat tampon sistemi olması nedeniyle çok önemlidir[23, 38, 39].

CA-III izoenzimi, iskelet kaslarında oluşan laktik asit/laklat dengesinde, pH değerini ayarlamak gibi çok önemli bir göreve sahiptir. CA-V izoenzimi bazı dokuların mitokondri matrikslerine yerleşmiş olarak bulunur. Karbamoilfosfat sentetaz-I ve piruvat karboksilaz enzimlerine sıralı olarak bikarbonat iyonu sağlanmasından dolayı, glukoneogenez ve ürogenizde rol oynadığı öngörülmektedir. Bu izoenzimin ayrıca lipogenaz olayında da etkili olduğu belirtilmiştir [40].

CA-VI izoenzimi tükrük bezlerinden salgılanan bir enzimdir. İnsan tükrüğünden izole edilmiş olup, tükrüğün pH dengesini sağladığı sanılmaktadır [41, 42].

Çizelge 1.3 Karbonik anhidraz izoenzimleri [43]

İZOENZİM...	KATALİK AKTİVİTE...	BULUNDUĞU BÖLGE...
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

1.1.7 Karbonik Anhidraz Enziminin Hastalıklar ile İlişkisi

CA enzimi proton ve bikarbonat iyonlarını üretip, pH değerinin düzenlenmesinde ve vücudumuzun farklı bölgelerindeki akışkan dengesinin kurulmasında anahtar rol oynar. Midemiz asit salgılanmasında rol alırken, aynı enzim pankreatik alkalın özsuyu ve doğal tükürüğün üretilmesine yardımcı olur. Böbrek ve gözlerde üretilen bikarbonat iyonları ve protonların taşınması, bu bölgelerdeki hücrelerin su içeriğini etkiler. Bu yüzden karbonik anhidraz izoenzimleri kendi spesifik bölgelerinde farklı fonksiyonlar gösterir ve yoklukları ve inaktiflik durumları, midedeki asit üretiminin azalmasından böbreklerin kaybına kadar uzanan hastalık durumları oluşturabilir[44-47].

hCA-II izoenzimi ile ilgili olarak, CA-II eksikliği sendromu belirlenmiştir. Bunun da kemiklerin kireçlenmesi, böbrek taşı oluşumu ve beyinde kireçlenme ile

ilgili olduğu gösterilmiştir. Bu da hCA-II izoenziminin kemik dokusu, böbrek ve beyin organları için ne derece önemli olduğunu ortaya koymaktadır [36, 37, 48, 49].

Kanser, hücre değişiminin ve çoğalmasının kontrolden çıkması ile gelişen bir hastalıktır. Çoğu kanser hücre tipleri kitlelere neden olur ve buna tümör ismi verilir. CA-IX ve CA-XII izoenzimleri tmrl hücrelerde aktivitelerini gösteren buna bağlı olarak da kanserlerle ilişkili olan izoenzimler olarak tesbit edilmişlerdir [50, 51].

1.2. Protein Saflaştırma Teknikleri

1.2.1 Afinite Kromotografisi

Afinite kromotografisi; bir biyolojik ligand (rneğin; substrat, koenzim, hormon, antikor, nükleik asit v.b.) veya onun sentetik bir analoğu ile saflaştırılmak istenen molekül üzerindeki komplementer bağlama bölgesi arasındaki spesifik etkileşimi esas alan bir çeşit adsorbsiyon kromotografisidir [53, 54]. Bu yöntem ile birçok ayırma ve saflaştırma işlemi kısa sürede gerçekleştirilebilir ve yüksek verimde binlerce defa saflaştırılmış bileşikler elde edilmektedir [58].

Bu teknikte matriks denilen katı destek materyaline ligand adı verilen özel bir molekül immobilize edilir. Bu spesifik molekül, saflaştırılmak istenen materyale karşı biyolojik ilgi duyarak onu belirli bir kuvvette dönüşümlü bir şekilde bağlamalıdır.

Ligandın, uygun yöntemlerle suda çözünmeyen Sephadex ve Sepharose gibi katı destek materyaline bağlanarak hazırlanması sonucu oluşturulan bir afinite kolonunda, saflaştırılması düşünülen bir molekül karışımı geçirilirse sadece istenilen molekül ligand tarafından kolonda tutulur. İstenmeyen bütün safsızlıklar, kolondan uygun bir tampon geçirilerek uzaklaştırılır. Kolonda tutulan ilgili molekül, spesifik elsyonla kolondan alınır. Spesifik elüsyon, ilgili moleküle liganttan daha yüksek afiniteye sahip madde içeren tampon çözelti ile gerçekleştirilir [55]. Bir afinite kromotografisi kolonunun çalışma prensibi şekil 1.6'da şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 1.3. Afinite kromatografisinin şematik gösterilişi [56].

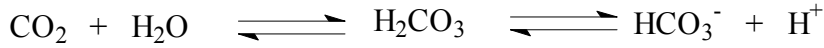
1.2.2 Karbonik Anhidraz Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için en çok uygulanan yöntem afinite kromatografisidir. Bu yöntemle hedef protein kısa zamanda ve tek basamakta yüksek verimle saflaştırılarak elde edilmektedir [53]. CA enziminin afinite kromatografisi ilk defa 1972 yılında Falkbring ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu tekniğe yönelik çalışmalar 1974 yılında Whitney, 1975 yılında Wistrand ve arkadaşları, aynı yıl Osborne ve Tashian, 1976 yılında Chanpagnol ve aynı yılı takiben Johensen, 1977 yılında Khalifah ve arkadaşları, 1980 yılında Wistrand ve aynı yılda Keha'nın araştırmalarını takiben 1987 yılında Kaul ve Mattiasson, 1995 yılında Arslan ve arkadaşları, 2000 yılında ise Demir ve arkadaşlarının araştırmaları ile devam etmiştir [46-52-57]. Chanpagnol dışında diğer araştırmacılar ligand olarak benzen sülfonamid türevleri, Chanpagnol ise bir heteroaromatik sülfonamid bileşiği olan asetozolamidi kullanmıştır. Bitki CA enzimi dışında ligand olarak benzen sülfonamid türevleri kullanılmıştır. Bunu nedeni, bitki CA enziminin benzen sülfonamidler tarafından çok az inhibe edilmesiyle açıklanmaktadır. Bu olayı uzantı koluna sahip afinite jellerinin yüksek bir kapasiteye sahip oldukları ile açıklanmaktadır. Ayrıca matrikse takılan uzantı kollarının farklılığı da kolon verimi üzerindeki değişik sonuçları beraberinde getirmektedir [38].

1.3. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayin Yöntemleri

1.3.1. CO₂-Hidrataz Aktivitesi

CA enziminin hidrataz aktivitesi, enzimin CO₂ molekülünün hidrasyonundan, HCO₃⁻ iyonunun dehidratasyonundan ve bazı esterlerin hidrolizinden sorumlu olma özelliğinden yararlanılarak belirlenmektedir.



Yukarıdaki reaksiyonda da görüldüğü üzere, ortamda ilk olarak CO₂ gazı açığa çıkmakta veya harcamakta, diğer taraftan da H⁺ konsantrasyonu artmakta veya azalmaktadır. İlk durum kantitatif olarak mamomerik yöntemlerle tespit edilebilse de reaksiyon pH'sının değişken olması, CO₂'in suda sınırlı çözünmesi gibi nedenlerden dolayı bu yöntem geçerli olmamaktadır.

Ortamdaki H⁺ konsantrasyonunun artması veya azalması reaksiyon pH'ını etkileyeceğinden, enzim aktivitesi indikatörle belirlenebilir. Enzim saflaştırma basamaklarında aktivite ölçümleri ,genellikle Wilbur-Anderson yöntemi ile yapılır .Bu yönteme göre pH değerinin 8.2'den 6.3'e düşüşü için geçen süre brom-timol mavisi indikatörü yardımıyla bulunmakta ve enzimin birimi ,enzimsiz CO₂ hidrasyon süresi (t₀) ile enzimli reaksiyon süreleri (t_c)arasındaki farkın (t_c)'ye bölünmesiyle elde edilmektedir.Buna göre;

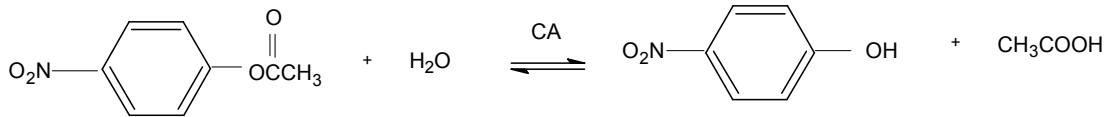
$$\text{Enzim Aktivitesi} = [(t_0) - (t_c)] / (t_c)$$

$$\text{Spesifik aktivite} = [10(t_0 - t_c) / (t_c)] / \text{mg Protein}$$

Formüllerinden hesaplanabilir[59].

1.3.2. Esteraz Aktivitesi

Kinetik çalışmalarda CA aktivitesi ölçümleri bu yöntemle belirlenmektedir. Bu yöntemde CA enzimi, substrat olarak kullanılan p-nitrofenil asetatı, p-nitrofenol ve p-nitrofenolata hidroliz eder ve bu da 348 nm dalga boyunda absorpsiyon göstermektedir. Reaksiyon denklemi aşağıdaki gibidir.



348 nm dalga boyu p-nitrofenol ve p-nitrofenolatın aynı absorbansı verdiği noktadır (izobestlik). Asidik özellik gösteren fenol grupları ortamın pH değerine göre- değişen oranda- fenolat ve H⁺ iyonlarına ayrışır. 348 nm dalga boyunda p-nitrofenol ne p-nitrofenolat iyonunun absorbansları aynı anda okunabildiği için, bu durum absorbans ölçümlerini etkilemez. P-nitrofenolün molar ekstraksiyon katsayısı, $\epsilon_{348} = 5,4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dir. Bu dalga boyunda p-nitrofenil asetatın molar ekstraksiyon katsayısı $\epsilon_{348} = 0,4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ve çok az bir absorpsiyon vardır [38].

1.4. Manyetik Alan

Manyetik alan, hareketli yüklü bir parçacığa etkiyen ve hareket yönüne dik olan kuvvet cinsinden tanımlanır [63]. Manyetik alan görülebilir yada hissedilebilir bir olgu değildir ancak sonuçları görülebilir yada hissedilebilir.

1750’de John Michell [63] manyetik kutupların birbirleri üzerine itici yada çekici kuvvetlerle etki ettiklerini ve bu kuvvetlerin söz konusu kutupların arasındaki uzaklığın karesi ile ters orantılı olarak değiştiğini göstermiştir. İki manyetik kutup arasındaki kuvvet, iki elektrik yükü arasındaki kuvvete benzemekle birlikte iki kuvvet arasında önemli bir fark vardır. Tek bir elektrik yükü mevcut olabilmekte

ancak tek bir manyetik kutup olamamaktadır. Yani manyetik kutuplar N ve S (kuzey ve güney kutbu) her zaman çiftler halinde bulunurlar [63].

Faraday, kutuplar arasındaki etkilerin bir manyetik alandan ileri geldiği fikrini ortaya koymuştur. Faraday elektrik alanda olduğu gibi manyetik alanda da kuvvet çizgileri kavramını ortaya koymuştur. Kuvvet çizgileri (+) kutuptan çıkar, (-) kutupta son bulur. En yoğun manyetik alan çizgilerinin gözlemlendiği bölge kutuplardır. Bir noktadaki manyetik alan şiddeti, o noktadaki kuvvet çizgisi yoğunluğuna eşittir [63].

1.4.1. Manyetizmanın Temel Kavramları

Manyetik malzemeler, süseptibilite ve permebilite özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır. Malzemenin manyetik durumu manyetizasyon vektörü (M) denen bir nicelik ile belirtilir. Manyetizasyon, malzemenin birim hacmindeki net manyetik moment sayısıdır ve büyüklüğü aşağıdaki gibidir.

$$M = \frac{m}{V} \quad (1.1)$$

Manyetizasyon M , manyetik alan şiddeti H ile orantılıdır.

$$M = \chi H \quad (1.2)$$

χ manyetik alınganlık veya süseptibilite denen boyutsuz bir çarpandır. Bağlı permebilite μ_r aşağıda gösterilmektedir.

$$\mu_r = \frac{\mu}{\mu_0} \quad (1.3)$$

μ permebilite, μ_0 boşluğun manyetik geçirgenlik sabitidir. μ_r bağlı permebilitenin süseptibilite ile olan ilişkisi gösterilmektedir.

$$\mu_r=(1+\chi) \quad (1.4)$$

Manyetik indiksiyona, manyetik alanın ve manyetizasyonun katkısı vardır.

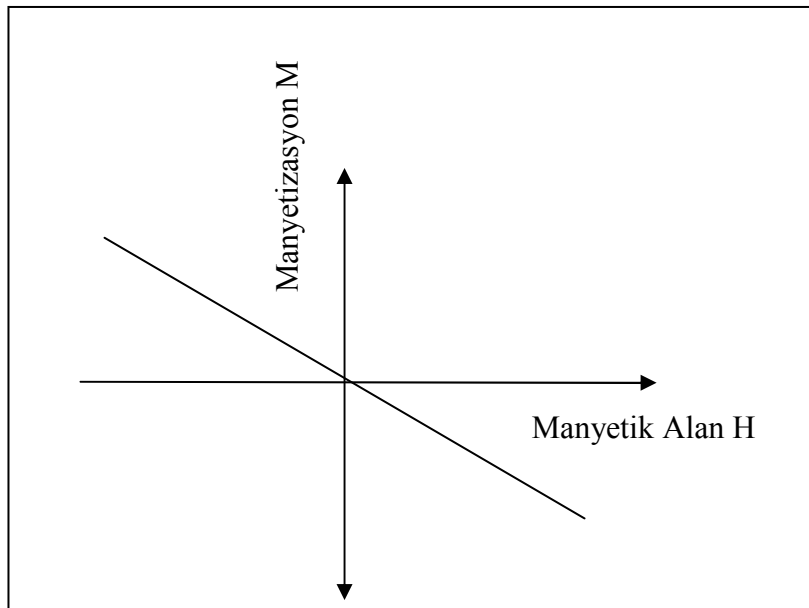
$$B= \mu_o(H+M) \quad (1.5)$$

Burada B Tesla, M A/m dir.

Manyetik malzemeler; Diamanyetizma, Paramanyetizma, Ferromanyetizma, Antiferromanyetizma ve Ferrimanyetizma olmak üzere 5 ana sınıfa ayrılmaktadır.

1.4.1.1 Diamanyetizma

Atomları sürekli manyetik dipol momente sahip olmayan maddelere diyamanyetik denir. Diamanyetik malzemeler bir atomun elektron kabukları dolu olduğunda sıfır net spin manyetik momentine ve net bir yörünge manyetik momentine sahip olurlar. Kapalı bir elektron kabuğu altındaki elektronların toplam manyetik momentleri sıfır olacak şekilde çiftlenmiş He, Ne, Ar, Kr gibi soygazlar ve manyetik momenti zayıf (O₂ ve N₂ dışında) gazlar, su ve gümüş, bakır, altın... gibi katılar bu gruba girerler. Diyamanyetik bir maddeye bir dış manyetik alan uygulandığında, bu alana zıt yönde zayıf bir manyetik dipol moment oluşturur [63].



Şekil 1.4: Diamanyetizma [64]

Tüm manyetik malzemeler diamanyetik bir bileşene sahiptir [62]. Şekil 1.4'de görüldüğü gibi diamanyetik malzemeler negatif bir süseptibiliteye sahip olup, süseptibilitesi paramanyetiklere ve ferromanyetiklere göre daha küçüktür. 10^{-5} ile 10^{-6} arasındadır.

Bir elektronun manyetizmaya olan katkısı onun kendi eksenini etrafında dönmesinden kaynaklanan spin manyetik momenti ile çekirdek etrafında dönmesinden kaynaklanan yörünge manyetik momentinin toplamıdır. Diamanyetizmada, elektronun manyetizmaya katkısı elektronun yörünge etrafında dönmesinden dolayıdır. Son yörünge dolu olduğu için elektronun spin hareketinden gelen bir katkı yoktur. Örnek; bakır, elmas, altın vb.

1.4.1.2 Paramanyetizma

Paramanyetiklerde manyetizasyon M , düşük alanlarda manyetik alan ile orantılıdır, süseptibilitesi diamanyetiklere göre büyüktür, 10^{-3} ile 10^{-5} arasındadır.

Paramanyetizma iyonik katılarda ve metallerde olmak üzere iki grupta açıklanmaktadır:

Bunlardan birincisi olan, iyonik katılarda paramanyetizma, Langevin teorisiyle açıklanır. Manyetik alanın sıfır olması durumunda net manyetizasyon sıfırdır ve atomik manyetik momentler rasgele dağılmış durumdadır. Bir manyetik alan uygulandığında manyetik momentler alan yönünde bir yönelim gösterir ve net bir manyetizasyon oluşur. İyonik katılarda paramanyetizma sıcaklığa bağlıdır, sıcaklık artarsa atomların termal hareketinin artmasıyla manyetik alan azalmaktadır.

İkinci tip olan ise metallerde Paramanyetizma, auli modeliyle açıklanır. Elektronlar metalin iletim bandında yer almaktadır. Manyetik alan sıfırken, eşit sayıda manyetik momentlerin her birinin yönü aynıdır. Manyetik alanın uygulanmasıyla elektronların dağılımı net manyetizasyon nedeniyle değişmektedir. Pauli ilkesine göre aynı kuantum sayısına sahip elektronlar aynı yörüngede

bulunamaz. Metallerde manyetizasyon sıcaklığa bağılı değildir. Çünkü elektronların termal hareketi yoktur.

Paramanyetizma, iyonik katılar ve metallerle karşılaştırıldığında süseptibilite iyonik katılarda büyük, metallerde küçüktür. Çünkü metallerde iletim bandındaki elektronlar, iyonik katılarda iletim bandındaki elektronlar gibi alan yönünde dönecek şekilde aynı serbestliğe sahip değildir.

1.4.1.3 Ferromanyetizma

Ferromanyetik malzemeler, M-H davranışı ile karakterize edilen histerezisi ve sıfır manyetik alanda kalıcı bir mıknatıslanmayı göstermektedir. Ferromanyetik malzemelerin süseptibilitesi diamanyetiklere ve paramanyetiklere göre büyüktür ve doyum manyetizasyonu düşük alanlarda meydana gelmektedir. Ferromanyetler doğal manyetizasyonunu kritik sıcaklık denilen Curie noktası sıcaklığında kaybeder. Curie noktası sıcaklığında ve yukarısında ferromanyetler özelliğini yitirir ve malzeme paramanyetik hale gelir. Buna Curie -Weiss Yasası denir. Ferromanyetlere örnek olarak; nikel, demir, kobalt ve bunların alaşımları.

Doğal manyetizasyonun (spontoneus manyetizasyon) anlaşılması üzerine yapılan çalışmalar, paramanyetik oldukları düşünülen ancak yüksek manyetik alınganlık gösteren sonradan ayrı bir sınıf oldukları anlaşılan ferromanyetik maddeler üzerine yapılmıştır. Buradan elde edilen sonuca göre; manyetik alan ile atomik manyetik momentlerin dizildiğini fakat bunun manyetik malzemenin kendi kendine bir manyetizasyonundan meydana geldiğini ileri sürülmüştür. Bu alan moleküler alan olarak isimlendirildi ve manyetizasyonla orantılıdır.

2.MATERYAL ve YÖNTEMLER

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışma için kullanılan; Sepharose 4-B afinite jeli, sülfanilamid, L-trozin, diyaliz torbaları, akrilamid, N, N, N',N'- tetra metil etilendiamin(TEMED), N,N'-metilen bisakrilamid, β - merkaptoetanol, SDS, glisin, coomassie brilliant blue G-250, coomassie brilliant blue R-250, fenol red boyar maddesi ve brom-timol mavisi Sigma Chemical Comp.'den; sodyum hidroksit, sodyum karbonat , trihidroksi metil aminometan (Tris), sodyum sitrat dihidat, sitrik asit, sodyum klorür, sodyum sülfat, sodyum perklorat, sodyum asetat, hidroklorik asit, asetik asit, sülfürik asit, fosforik asit, sodyum nitrat, sodyum tiyosiyanat ve sodyum siyanür Merck A.G'den; sodyum monohidrojen fosfat, sodyum dihidrojen fosfat, metanol, etanol, amonyum persülfat ve dekstroza Riel de Haen A.G'den; karbondioksit gazı piyasadan sağlanmıştır.

2.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Bu çalışmada aşağıda isimlendirilen alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

Buz Makinesi	: Fiocetti Scotsman otomatik buz makinesi
Çalkalayıcı	: Biolab 1575-2B çalkalayıcı
Elektrofez Tankı	: Hofer, HSI
Etüv	: Elektromag
Kromatografi Kolonu	: Pharmacia
Kronometre	: Hanhard, Elektronisch Digital Stoppuhr
Magnetik Karıştırıcı-Isıtıcı	: ARE Magnetic, heating stirrer IKA Combimag RCO
Masa Santrifüjü	: Hettich Zentrifugen EBA 12 R
Otomatik Pipetler	: Eppendorf, Medisis

Peristaltik Pompa	: Pharmacia (Chromatograph Attd. S1211)
pH-metre	: Orion-model 920 A
Soğutmalı Santrifüj	: Sigma Laborzentrifügen 3K 15/10706 / 10707
UV-Spektrofotometresi	: CARY 1E, UV- Visible Spectrophotometer- VARIAN
Vorteks	: Fisons Whirli Mixer
Hassas Terazi	: Libror, AEG-220 (Shimadzu)
Jel Görüntüleme Sistemi	: Gel Doc-H Imaging System (UVP)
Elektromagnet	: Lake Shore (EM4-CS)
Güç Kaynağı	: Lake Shore (660)
Gaussmetre	: Hirst Magnetic Instruments (GM05)
VSM	: ADE Magnetics (EV9)

2.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Çalışmanın deneysel kısımlarında kullanılmak üzere aşağıda isimlendirilmiş çözeltiler hazırlanmıştır.

2.1.3.1. Sepharose 4B Jel Sentezinde Kullanılan Yıkama Tamponu :0.2 M NaHCO₃ (pH=8.8): 16.8 g (0.02 mol) NaHCO₃ 950 mL suda çözülür. 1M NaOH ile pH=8.8'e ayarlanarak toplam hacmi 1L'ye tamamlanır.

2.1.3.2. Sepharose 4-B Jel Sentezinde Kullanılan Saklama Tamponu; 0,1 M NaHCO₃(pH=10.0): 8.4 g (0.01) NaHCO₃ 950 mL distile suda çözülür. 1 M NaOH ile pH=10'a ayarlanarak toplam hacim 1L'ye tamamlanır.

2.1.3.3 .Afinite Jeli Dengeleme Tamponu; 25 mM Tris – HCL / 22 mM Na₂SO₄ (pH=8,7): 14,20 g (22 mmol) Na₂SO₄ ve 3,0275 g (25 mmol) tris 950mL destile suda çözülür . 1M HCL ile pH=8,7'ye ayarlanarak toplam hacim 1L'ye tamamlanır.

2.1.3.4.(Hemolizat Tatbikinden Sonra) Afinite Jeli Yıkama Tamponu; 25mM Tris-HCL / 22mM Na₂SO₄ (pH=8,7): 3,124 g (22 mmol) Na₂SO₄ ve 3,0275 g (25mmol) tris 950mL destile suda çözülür. 1 M HCl ile pH=8,7'ye ayarlanarak toplam hacim 1 L'ye tamalanır.

2.1.3.5. hCA Elüsyon Tamponu: hCA-I izoenziminin elüsyonu için; 1 M NaCl / 22 mM Na₂HPO₄ (pH=6,3), 3,55 g (25 mmol) Na₂HPO₄ ve 29,25 g (0,5 mol) NaCl alınıp, pH 6,3'e getirildikten sonra toplam hacim 500 mL'ye destile su ile tamamlandı. hCA-II için ise 0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄ (pH 5.6), 15,31 g (0,075 mol) NaClO₄ ve 3,4 g (0,2 mol) NaCH₃COO, 200 mL destile su içinde çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 5,6'ya getirildikten sonra, toplam hacim destile su ile 250 mL'ye tamamlandı.

2.1.3.6. CO₂- Hidrataz Aktivite Tamponu; 0,15 M Na₂CO₃ / 0,10 M NaHCO₃ (pH = 10,0): 15,9 g (0,15 mol) Na₂CO₃ ve 8,4 g (0,1 mol) NaHCO₃ 1 L destile suda çözülerek çözelti hazırlanır.

2.1.3.7. CO₂- Hidrataz Aktivitesi Tamponu: 0,01256 g fenol-red ve 0,2184 g NaHCO₃ 1 L destile suda çözülerek hazırlanır.

2.1.3.8. CO₂-Hidrataz Aktivitesi CO₂ çözeltisi: 0 °C'de yarım saat süreyle destile su içerisinde CO₂ geçirilerek hazırlanır.

2.1.3.9.SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponu;

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2.5 ml
% 10'luk SDS	4.0 ml
Gliserol	2.0 ml
β-merkaptoetanol	1.0 ml
Bromfenol mavisi	0.01 g
Destile su	0.5 ml

2.1.3.10. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan tank tamponu;

Tris-HCl	3 g
Glisin	14.4 g
SDS	1.0 g

Destile su ile çözeltinin son hacmi 1 L'ye tamamlanır

2.1.3.11. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının hazırlanışı ve kullanılan miktarları Çizelge 2.1'de verilmektedir.

2.1.3.12. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi: 0.66 g Coomassie brilliant blue G-250, 120 ml metanolde çözüldü. Bu çözeltiye 24 ml saf asetik asit ve 120 ml destile su ilave edildi.

2.1.3.13. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi: % 7.5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87.5 ml destile su içermektedir. Bu amaçla 75 ml asetik asit ve 50 ml metanol, 875 ml saf su ile karıştırıldı.

2.1.3.14. SDS-PAGE Elektroforezi:Numune Tamponu

0.5 M Tris-HCl (pH=6.8)	2,5 mL
%10'luk SDS	4.0 mL
Gliserol	2.0 mL
β -merkapt etanol	1.0 mL
Brom-timol mavisi	0.01 mL
Destile su	0.5 mL

Çizelge 2.1. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları.

	Ayrırma Jeli	Yığıma Jeli
	%10	%3
<p><u>Akril amid/Bis</u></p> <p>Akril amid 15 g Bis 0,4 g Alınarak son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.</p>	16.65	2.6 mL
Destile su	20.1 mL	12.2 mL
<p><u>1.5 M tris-HCL (pH 8.8)</u></p> <p>Tris-HCl 11.82 g Alınarak pH 8.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.</p>	12.5 mL	–
<p><u>0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)</u></p> <p>Tris-HCl 3.94 g Alınarak pH 6.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.</p>	–	5mL
<p><u>% 10 'luk SDS</u></p> <p>SDS 1g Alınarak son hacim destile su ile 10 mL'ye tamamlanır.</p>	0.5µL	200µL
TEMED	25 µL	20µL
<p><u>%10'luk amonyum persülfat</u></p> <p>Amonyum persülfat 1g Alınarak son hacim destile su ile 10 mL'ye tamamlanır.</p>	750µL	400µL

2.2. YÖNTEMLER

2.2.1. Afinite Jelinin Hazırlanması

Afinite jeli, Sepharose 4B katı destek materyali üzerinde hazırlanmıştır. Sepharose 4B'nin serbest -OH grupları literatürde daha çok CNBr ile aktifleştirilmiştir. Bu çalışmada da aynı yöntem kullanılarak Sepharose 4B afinite jelinin CNBr ile aktifleştirilmesinden (Şekil 2.1.) sonra, tirozin kovalent olarak bağlandı (Şekil 2.2.) . Daha sonra sülfonamid diazolanarak L-tirozine kenetlendirildi. Burada afinite jelinin; uzantı kolunu L-tirozin, enzimi spesifikolarak bağlayan kısmını da sülfonilamid oluşturur. Sülfonilamid karbonik anhidraz enziminin spesifik bir inhibitörüdür. Afinite jelinin yapısına girerek CA enziminin yüksek oranda saflaştırılmasında başarı ile kullanılmıştır.

Afinite jeli aşağıda anlatılan prosedüre göre hazırlanmıştır.

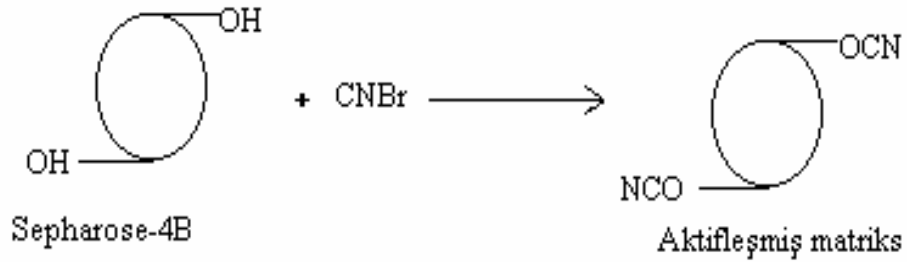
2.2.1.1. Sepharose 4B'nin Aktifleştirilmesi ve L-Tirozinin kolona eklenmesi

20 mL kadar Sepharose 4B jeli destile su ile iyice yıkanarak dekante edildi. Eşit hacimdeki destile su ile birleştirilerek bir süspansiyon elde edildi. Karıştırılmakta olan süspansiyona 4 g toz haline getirilmiş CNBr katıldı. pH-metre kullanılarak süspansiyonun pH'sı 4 M NaOH ile hemen 11 değerine çıkarılarak reaksiyon bu pH değerinde sabit tutuldu. Reaksiyona pH değişmeyinceye kadar devam edildi (10-15 dakika). Çok miktarda buz süspansiyona katıldıve karışım bir buncher hunisine nakledildi. Daha sonra 250 mL soğuk 0,1 M NaHCO₃ tampon çözeltisi (pH=10) ile yıkandı ve bir behere aktarıldı. Aynı tamponun 20 mL'sinde 8 mg tirozin çözülmüş soğuk çözelti behere ilave edilerek yavaşça karıştırılan süspansiyonda, bağlanma derecesini öğrenmek için, her 15 dakika içinde jel bulunmayan 0,2 mL örnek alındı ve 1 M NaOH çözeltisi ile 20 mL'ye tamamlanarak 294 nm dalga boyunda absorbansı belirlendi. İşleme absorbans değerinde önemli bir değişme olmayıncaya kadar devam edildi. Bir süre (bağlanma süresi) yaklaşık 90 dakika sürdü. Bundan

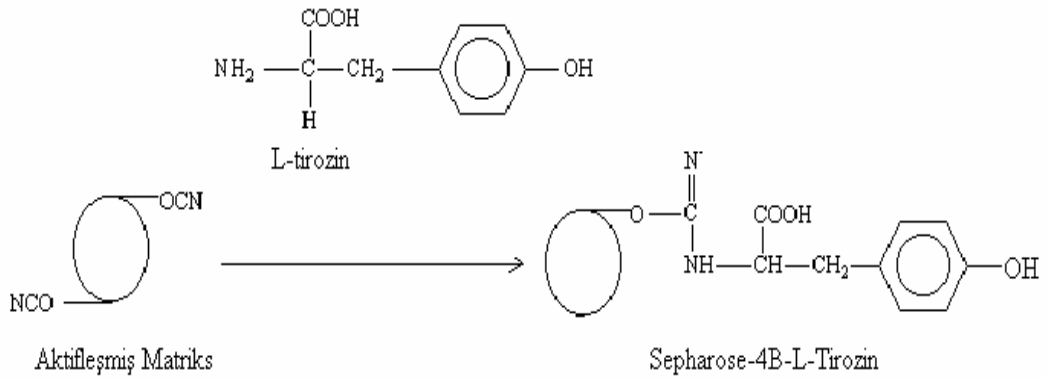
sonra süspansiyon, 4°C’de 16 saat süresince bekletildi. Bu sürecin sonunda jel, yıkama suyu 280 nm dalga boyunda absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen ortamdaki uzaklaştırılmış oldu. Yıkama 100 mL 0,2 M NaHCO₃ tamponu (pH=8,8) ile tekrarlandı. Tirozin takılı jel aynı tamponun 40 mL’si içine alındı.

2.2.1.2. Sülfonamidin Kenetlenmesi

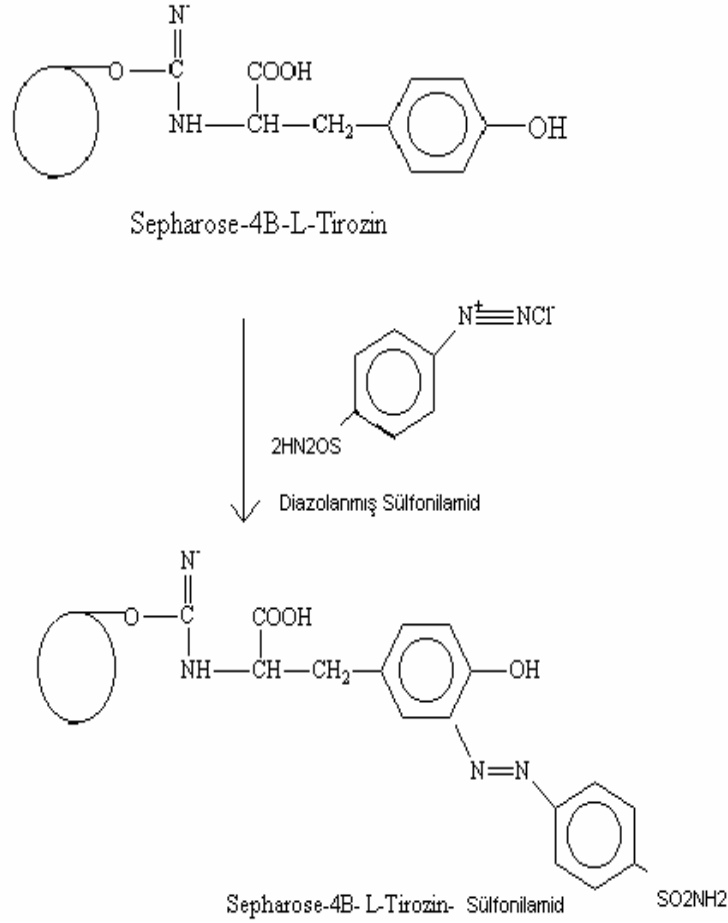
25 mg sülfonilamid, 0 °C civarında 10 mL 1 M HCl içerisinde çözüldü. 75 mg NaNO₂ ihtiva eden 0 °C’deki 5 mL çözelti, sülfonilamid çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakika reaksiyondan sonra diazolanmış olarak bulunan sülfonilamid 40 mL Sepharose 4B-L-Tirozin süspansiyonuna ilave edildi. pH=9,5 değerine çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 1 L destile su ve 200 mL 0,05 M Tris-SO₄ (pH=7,5) tamponu ile yıkandı ve aynı tampon içerisinde saklandı [38-53-54].



Şekil 2.1. Sepharose 4B’nin aktifleştirilmesi [60]



Şekil 2.2. L-tirozinin Bağlanması [60]



Şekil 2.3. Sülfonamid Bileşiğinin Bağlanması

2.2.2. Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin (hCA I ve hCA II) Saflaştırılması

2.2.2.1. Kan Numunelerinin Alınması ve Hemolizatın Hazırlanması

Deneyle için antikoagülanlı tüplere sağlıklı insanlardan yaklaşık 20 mL kan alınmış ve kanlar hemen çalışılmıştır.

İnsan kanı, eritrositlerin ayrılması amacıyla, 1,5 mL'lik ependorflara konuldu ve 10 dakika boyunca 5000 rpm'de santrifüj edildi. Serum ve eritrosit tabakaları ayrıldı. Altta kalan eritrositler % 0,9'luk NaCl çözeltisi ile 2 defa yıkanıp üstte kalan

kısımlar atıldı. Bu işlemler sonucunda yaklaşık 5 ml eritrosit elde edildi. Elde edilen eritrositler, kendi hacimlerinin 1,5 katı soğuk destile su ile karıştırıldı ve hemoliz olayının tamamlanması için 0 °C sıcaklıkta karıştırıldı. Elde edilen hemolizat, hücre zarlarının ayrılması için 4 °C sıcaklıkta 15000 rpm'de santrifüj edildi. İşlem sonrasında tüplerdeki süpernatant alınarak dibe çökmüş olan hücre zarları atıldı. Hemolizatın pH değeri, afinite kolonuna tatbik edilebilmesi için, katı Tris ile 8,7 değerine ayarlandı.

2.2.2.2. Hemolizatın Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enziminin Elüsyonu

Hazırlanan afinite jeli 1.8 cm ×12 cm boyutundaki bir kolona paketlenerek 25 mM Tris-HCL /0.1 M Na₂ SO₄ (pH=7.0) tampon çözeltisi ile dengelendi. Hemolizat kolona tatbik edildikten sonra yıkama tamponu (25 mM Tris-HCL/22 mM Na₂ SO₄) (pH=7.0) ile yıkandı. Böylece CA enziminin büyük bir kısmı kolona tutunmuş ve istenmeyen safsızlıklar ortamdan uzaklaştırılmıştır.

hCA-I ve hCA-II izoenzimleri direkt hemolizattan saflaştırılmıştır. Bu amaçla hCA-I izoenziminin elüsyonu için; 0,1 M NaCH₃COO / 0,5 M NaClO₄ (pH=5,6), 1 M NaCl / 22 mM Na₂HPO₄ (pH=6,3), hCA-II için ise 0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄ (pH 5.6) elüsyon tamponları kullanılarak 5'er mL fraksiyonlar halinde tüplere alınmıştır. Elüsyon işlemi sırasında peristaltik pompanın akış hızı 20 mL /saat olarak ayarlanmıştır. Her bir eluat için,280 nm dalga boyunda kalitalif protein tayini ve CO₂.hidrataz aktivitesi tayini yapıldı [57].

2.2.2.3. Karbonik Anhidraz Aktivite Tayini (CO₂-Hidrataz Aktivitesi)

Karbonik anhidraz enziminin aktivite ölçümleri esnasında Maren ve arkadaşlarının geliştirmiş oldukları yöntem kullanıldı. Bu yöntem, CO₂'in hidrasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ sebebiyle pH değerinin 10,0'dan 7,4'e düşmesi için geçen sürenin ölçülmesi prensibindedir. Burada indikatör olarak, pH=7,4'de renk değiştiren fenol kırmızısı kullanıldı. Tampon olarak da pH değeri 10,0 olan karbonat tamponundan yararlanıldı.

Deney prosedürü şu şekilde gerçekleştirildi; reaksiyon tüpüne önce 2 ml indikatör ve 1,5 ml doymun CO₂ çözeltileri konuldu. Bu karışımın üzerine, saflaştırılan enzimden 0,1 ml ilave edildikten hemen sonra aynı anda 0,4 ml tampon katılarak kırmızı rengin sarıya dönmesi için geçen süre kronometre ile belirlendi (tc). Aynı işlemler, her numunenin çalışılmasından önce enzim çözeltisi yerine 0,1 ml destile su konularak yapıldı (to). Bu yöntemle göre, karbonik anhidraz (CA) aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU), enzimsiz olarak meydana gelen CO₂ hidrasyonu süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Buna göre;

$$EU = (to - tc) / tc$$

formülüne göre, enzim ünitesi hesaplandı.

2.2.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) İle Enzim Saflığının Kontrolü

hCA izoenzimlerinin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yığma jeli % 3, ayırma jeli % 10 konsantrasyonlarında olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektrofrez (SDS-PAGE) Laemelli [55] tarafından belirtilen yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi [57].

Bu amaçla elektrofrez cam plakaları önce su, sonra etil alkol ile iyice temizlendi. Daha sonra plakalar arasına plastik aralık oluşturucusu yerleştirilerek iki cam plaka birbiri üzerine konuldu ve elektrofrezin dökme aparatına sabitlendi. Çizelge 2.1'de belirtildiği şekilde hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üstten 2-3 cm kalana kadar enjektörle döküldü. Jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için n-bütanol ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (1 gece) üst yüzeydeki n-bütanol

döküldü. Daha sonra cam plakaların arasına tamamen doluncaya kadar polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yığma jeli ilave edildi. Jel kasetindeki yükleme jelinin üzerine tarak dikkatlice yerleştirilerek jelin polimerleşmesi beklendi (30 dakika). Yükleme jeli polimerleştikten sonra tarak kuyucukların arasının bozulmamasına dikkat edilerek çıkarıldı. Kuyucuklar önce saf suyla sonra tank tamponuyla yıkandı. Polimerize jellerin bulunduğu kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Afinite kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonlardan yüksek aktivite gösterenler birleştirildi. Elde edilen çözelti toplam hacim 100 µl olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. β-galaktosidaz (116.0kDa), sığır serum albumin (66,2.kDa), yumurta albumini (45.0 kDa), laktat dehidrogenaz (35,0 kDa), endonükleaz (25.0 kDa), β-laktoglobulin (18.4 kDa) ve Lizozim (14.4 kDa) içeren standart protein çözeltisi 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Jele yüklenecek numuneler 3 dakika 100 °C'de termoblokta bekletildi. Numuneler soğutularak kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak 80 volt'a ayarlandı. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune tamponu içindeki boyaya ait bant ayırma jeline ulaştığında voltaj 150 volt'a yükseltildi. Yürütme işlemine proteinler, jelin altına 1cm kalana kadar devam edildi. Daha sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı yığma jeli kesilip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi içine konuldu ve 1.5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerine bırakıldı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkartılarak renksizleştirme çözeltisine kondu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde çalkalandı. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra jel görüntüleme sistemi (UVP) ile görüntü bilgisayara aktarıldı.

2.2.4. Titreşimli Örnek Magnetometresi (VSM) ile örneklerin manyetik özelliklerinin belirlenmesi

Vibrating Sample magnetometer (VSM, ADE, EV9 Model), düzgün manyetik alan içinde titreşen örneğin bulunduğu ve bulk manyetizasyon ilmeğinin ölçüldüğü bir cihazdır. VSM'in çalışma prensibi elektromanyetik indüksiyon olayına dayanır.

Bir örnek dc manyetik alanda titreşim yapar ve örneğin titreşim manyetik alanı Faraday İndüksiyon yasasına göre algılayıcı bir voltaj indükler. Faraday Yasasında emk, bobin içindeki manyetik akının zamanla değişim hızıyla orantılıdır.

$$E = - \frac{d\phi}{dt} \quad (3.1)$$

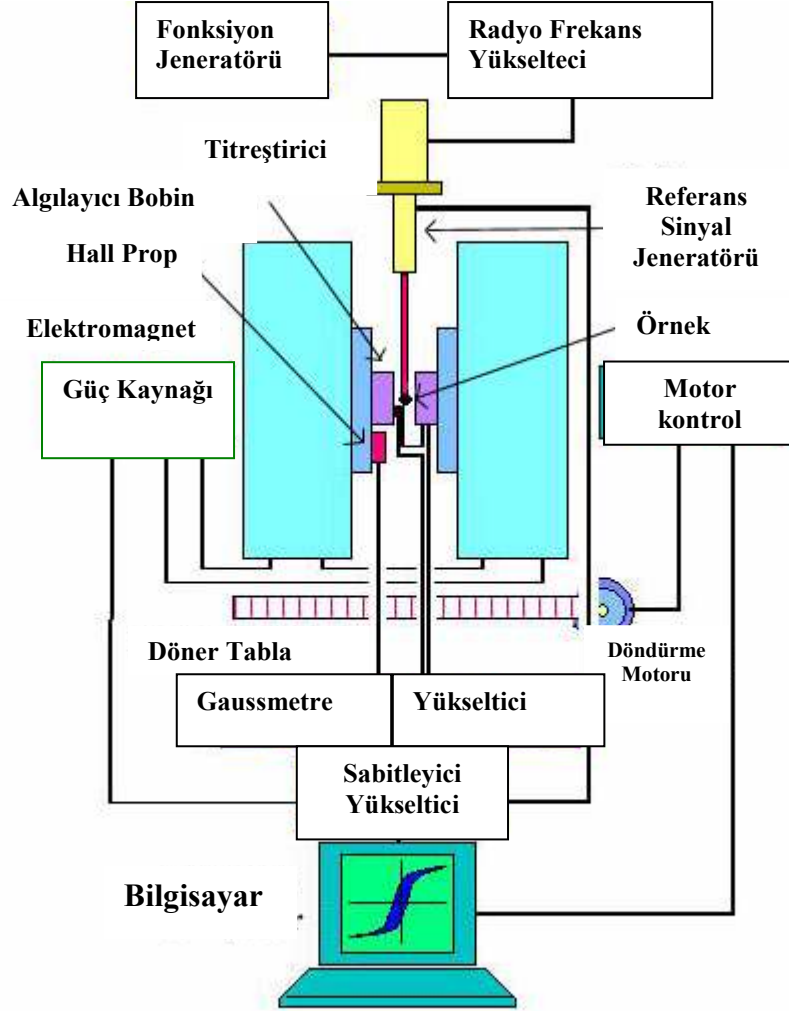
Burada E, elektromotor kuvveti (emk) ve ϕ örnek ile bobini ilişkilendiren manyetik akıdır. İndüklenen elektromotor kuvvet ölçülebilir ve örneğin manyetizasyonu ile orantılıdır. Boyutları ve doyum manyetizasyonu bilinen bir standart örnek kullanılarak sistem tam manyetizasyon değerlerini verecek şekilde kalibre edilebilir.

Sistem Özellikleri:

Kullanılan VSM ticari bir alettir olup, sistemi meydana getiren tüm bileşenler bilgisayardan ayrı olarak dizayn edilmiştir. Kütlesi yada hacmi bilinen bir örneğin, VSM manyetik momentini ölçülür. Bulunan bu değer kütleye veya hacme bölünerek, doyum manyetizasyonunu elde edilir. Bu çalışmada kalibrasyon için standart bir nikel örneği kullanılmıştır [64, 65]

Örnek, elektromanyetin kutupları arasına titreşici bölümüne bağlı olan naylon silindir örnek tutucu ile monte edilir ve örnek kutuplar arasında merkeze yerleştirilir. Ölçümler 75 Hz' lik titreşim frekansında yapılmıştır [64, 66].

Manyetik ölçümler, manyetik alan +23000mT'dan -23000mT'ya kadar çevrilerek, daha sonra 23000mT 'ya geri çevrilerek bir manyetizasyon devri tamamlanmış olur. Uygulanan manyetik alan $B = \mu_0 H$, $\mu_0 = 4\pi 10^{-7}$ H/m kullanılarak SI birimine dönüştürülebilir. Tamamlanan manyetizasyon ilmekleri manyetik momente (m) karşı, manyetik alan H şeklinde alındı. [64, 66]. Tüm işlemler oda sıcaklığında yapıldı ve bilgisayar ortamında, VSM yazılımı ile kontrol edildi.



Şekil 2.4 VSM'in şematik gösterimi[73,74]

2.2.5. Manyetik alanın izoenzimler üzerindeki etkisi

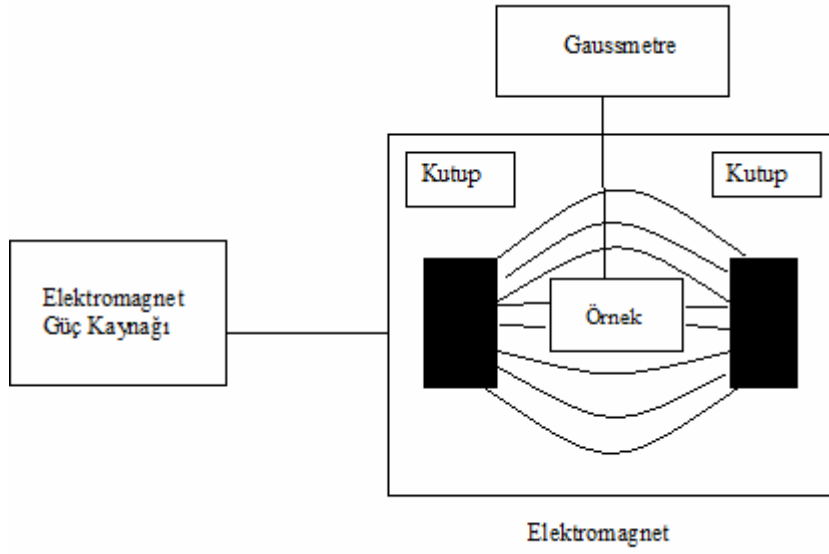
2.2.5.1. Manyetik Alan Ölçüm Sistemi

Manyetik alan ölçüm sistemi içerisinde kullanılan cihazlar ve bu cihazların teknik özellikleri ile kullanımı aşağıdaki şekilde maddeler halinde anlatılmaktadır.

1. Elektromagnet: Manyetik alan ölçüm sisteminde elektromagnet (LakeShore, EM4-CS Model) kullanılmıştır. Elektromagnet, güç kaynağı yardımıyla gerekli olan manyetik alan oluşturmaya yarayan cihazdır. Böylece sıfırdan başlayarak gerekli olan pozitif ve negatif büyüklükteki manyetik alanın maksimum değerleri arasında ölçüm yapılabilir.

2. Güç kaynağı: Güç kaynağı (Lakeshore, Model 660 serisi) magnetoresistance ölçüm sistemi kurulduktan sonra elektromagnette manyetik alan oluşturmak ve oluşan manyetik alan değerini değiştirmek için kullanılır. Güç kaynağında pozitif ve negatif kutup başları değiştirildiğinde pozitif veya negatif manyetik alan değerleri elde edilir.

3. Gaussmetre: Manyetik alan ölçmek için, ölçüm sisteminde (Hirst Magnetic Instruments Ltd., GM05 Model) gaussmetre kullanılmıştır. Gaussmetre, elektromagnetin kutup başları arasına dik olacak şekilde yerleştirilir. Böylece güç kaynağı ile oluşturulan manyetik alan değeri, manyetik alan birimlerinden; Oersted (Oe), Gauss (G), Tesla (T) olarak, gaussmetre üzerinde okunur ve kaydedilir.



Şekil 2.5 Manyetik alan ölçüm sistemi

2.2.5.2 Sabit manyetik alanda farklı sürelerde, manyetik alanın izoenzimler üzerindeki etkisi

Afinite kromatografisi ile elde edilen saf hCA-I ve hCA-II 10 000 Oe şiddetindeki manyetik alanda 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7 saat süre ile oda sıcaklığında bekletildi. Enzimi manyetik alana bırakmadan önce aktivitesi belirlendi. Söz konusu enzim manyetik alana bırakıldıktan sonra yeniden aktivitesi belirlendi. İki aktivite arasındaki fark manyetik alanın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi olarak belirlendi. Ayrıca enzimin oda şartlarında belirlenen sürelerde aktivitesinde oluşabilecek değişiklikleri gözlemek için kontrol grubu oluşturuldu. Aynı şartlarda hazırlanan enzim belirtilen sürelerde oda sıcaklığında manyetik alan bulunmayan bir yerde bekletilerek başlangıç ve sonraki aktiviteleri belirlendi. Aktivitede gözlenen değişim manyetik alanın etkisinin belirlendiği enzim aktivitesi ile karşılaştırıldı.

2.2.5.3 Farklı şiddette ve sabit zaman aralıklarında, manyetik alanın izoenzimler üzerindeki etkisi

Farklı şiddetteki manyetik alanın söz konusu izoenzimler üzerindeki etkisini araştırmak için sırasıyla; 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000 Oe manyetik alan şiddetlerinde oda sıcaklığında 1'er saat süreyle bekletilmiştir. Yukarıda açıklandığı gibi manyetik alan uygulanmamış kontrol grubunun başlangıç aktivitesi ve son aktivitesi belirlenip, manyetik alana maruz bırakılan enzimlerin aktiviteleriyle birlikte incelendi.

2.2.5.4.Sabit manyetik alanın farklı pH'larda izoenziler üzerindeki etkisi

Afinite kromatografisi ile hCA-I ve hCA-II izoenzimleri bölüm 2.2.2.2'de belirtildiği gibi elüsyon tamponuyla elüve edildikten sonra pH'ı 6,0 olan Tris sülfat tamponuna karşı diyaliz edilmiştir. Manyetik alanın farklı pH ortamlarındaki izoenzimlere etkisini araştırmak için enzim çözeltilerinin pH'ları katı Tris-Base kullanılarak 6, 7, 8 ve 9'a ayarlanmıştır. Enzim çözeltilerinin pH'ları ayarlandıktan sonra, 1 saat süreyle 10000 Oe manyetik alan uygulandı. Başlangıç ve manyetik alan uygulandıktan sonra aktivitede meydana gelen değişiklikler yine aynı pH'da belirlenen kontrol aktivitesi ile karşılaştırıldı.

2.2.5.5. Sabit manyetik alanın farklı iyonik şiddetlerdeki izoenzimler üzerine etkisi

Saf enzimlerin farklı iyonik şiddette manyetik alandan etkilenmelerini araştırmak için enzim çözeltilerine 5 farklı konsantrasyonda Na₂SO₄ (0,05M, 0,1M, 0,15M, 0,20M ve 0,25M) eklendi. Her bir iyonik şiddette bulunan enzim çözeltileri 10000 Oe şiddetinde manyetik alana oda sıcaklığında 1 saat süreyle bırakıldı. Aynı konsantrasyonda tuz içeren kontrol grubunun aktivitesi de belirlenerek manyetik alanda bulunan enzim aktivitesi ile birlikte incelendi.

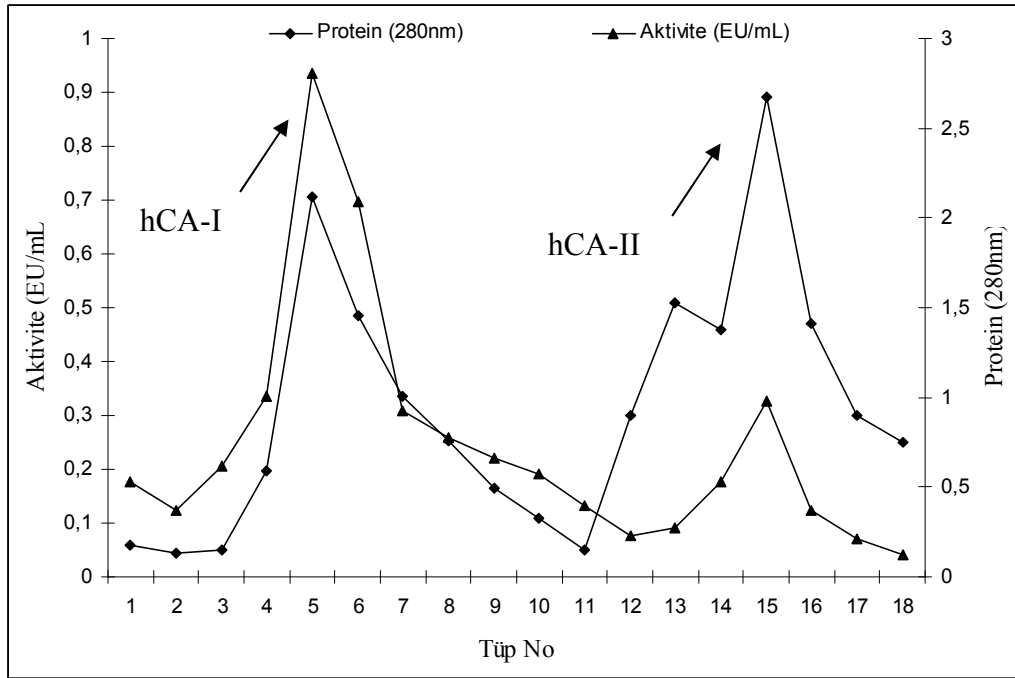
2.2.5.6. Sabit manyetik alanın inhibitör içeren izoenzimler üzerindeki etkisi

Söz konusu saf izoenzimlerin inhibisyonu üzerine manyetik alanın etkisini belirlemek için hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin bilinen iki farklı inhibitörü kullanıldı. İnhibitör olarak seçilen sülfonilamid ve perklorat saf enzim çözeltilerine IC₅₀ konsantrasyonlarında eklendi. Kısaca enzim aktivitesini %50 oranında azaltan konsantrasyonda inhibitör eklenmiş oldu. Daha sonra inhibitör içeren enzim 10000 Oe manyetik alan şiddetine 1 saat süreyle maruz bırakıldı. Manyetik alana bırakılmadan önceki ve 1 saat sonraki enzim aktivitesinde meydana gelen değişim yine aynı şartlarda hazırlanan kontrol grubu aktivitesindeki değişimle ile karşılaştırıldı.

3.BULGULAR

3.1. Afinite Kromatografisi İle hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerin Saflaştırılması

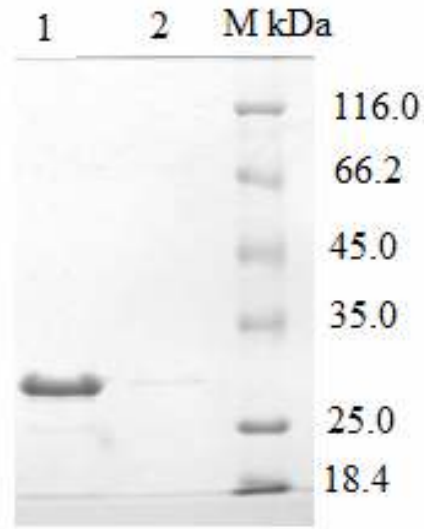
hCA-I izoenziminin elüsyonu için; 0,1 M NaCH₃COO / 0,5 M NaClO₄ (pH=5,6), 1 M NaCl / 22 mM Na₂HPO₄ (pH=6,3), hCA-II için ise 0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄ (pH 5.6) elüsyon tamponları kullanılarak 5'er mL fraksiyonlar halinde tüplere alınmıştır. Elüsyon işlemi sırasında peristaltik pompanın akış hızı 20mL /saat olarak ayarlanmıştır. Yıkama ve elüsyon işlemi 280 nm'deki absorbans sıfır oluncaya kadar devam edildi. Elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı protein miktarı (Şekil 3.8. ve 3.9.)belirlendi. 280 nm'de en yüksek absorbans ve aktivite gösteren tüpler birleştirildi (Şekil 3.7.a ve 3.7.b). Birleştirilen tüplerde hCA-I ve hCA-II enzimleri üzerinde BGD'lerin inhibisyon etkilerine CO₂ hidrataz aktivitesi ile bakıldı.



Şekil 3.1. hCA-I ve hCA-II enziminin elüsyon grafiği

3.2. hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerinin SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan hCA-I ve hCA-II enzimlerinin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS poliakrilamid jel elektroforezine hCA-I ve hCA-II enzimleri numuneleri tatbik edildi. Protein bantları içeren jellerin görüntüleri jel görüntüleme sistemi ile bilgisayara aktarıldı (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan hCA-I ve hCA-II enzimlerinin SDS-PAGE görüntüleri. 1. sütun hCA-I, 2. sütun hCA-II, molekül ağırlık standartları (M kDa) β-galaktosidaz (116.0kDa), sığır serum albumin (66,2.kDa), yumurta albumini (45.0 kDa), laktat dehidrogenaz (35,0 kDa), endonükleaz (25.0 kDa) ve β-laktoglobulin (18.4 kDa).

3.3. hCA-I ve hCA-II İzoenzimlerin Aktivite Tayini

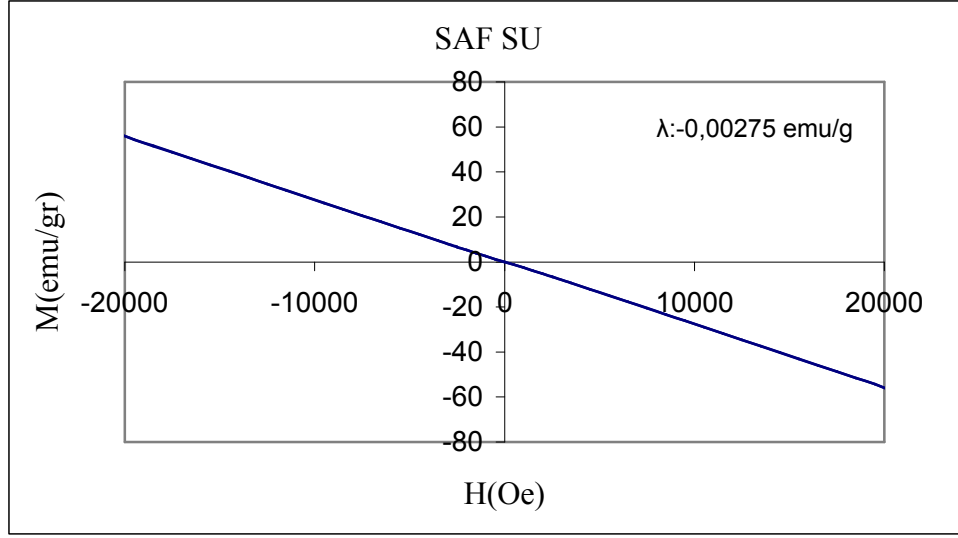
BDG'lerin hCA-I ve hCA-II enzim aktivitelerine etkilerini belirlemek için Devlet Hastanesi'nden alınan kanlarla çalışıldı ve afinite kromatografisi ile hCA-I ve hCA-II enzimleri saflaştırıldıktan sonra CO₂ hidrataz aktivitesi ile aktivite belirlendi.

hCA-I ve hCA-II enzimleri aktivitesi belirlenmesinde, tüpte toplam hacim 4 mL'dir. Ortamdaki H^+ konsantrasyonunun artması veya azalması reaksiyon pH'ını etkileyeceğinden, enzim aktivitesi indikatörle belirlenebilir. Bu yöntemle göre pH değerinin 8.2'den 6.3'e düşüşü için geçen süre brom-timol mavisi indikatörü yardımıyla bulunmakta ve enzimin birimi ,enzimsiz CO_2 hidrasyon süresi (t_0) ile enzimli reaksiyon süreleri (t_c) arasındaki farkın (t_c)'ye bölünmesiyle elde edilmektedir.

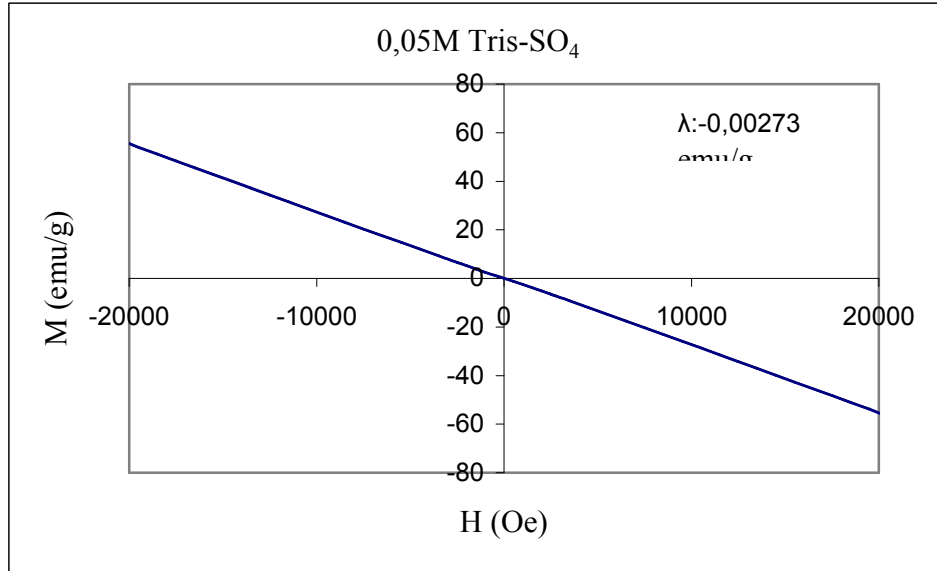
3.4. İzoenzimlerin ve kullanılan çözeltilerin manyetik özelliklerinin belirlenmesi

hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin manyetik alanda ölçüm yapılan şekilleriyle manyetik özellikleri VSM ile analiz edilmiştir. Bunun yanı sıra enzimlerin içinde bulunduğu çözelti ve saf suyunda manyetik özellikleri belirlenmiştir. Enzimlerin pH'ları katı tris base kullanılarak ayarlandı ve onlarında manyetik özellikleri belirlendi. Na_2SO_4 kullanılarak iyonik şiddet değiştirildi ve yine VSM ile ölçümler yapıldı. IC_{50} değerinde perklorat ve sülfonilamid inhibitörleri eklendi ve onlarında VSM ölçümleri yapıldı.

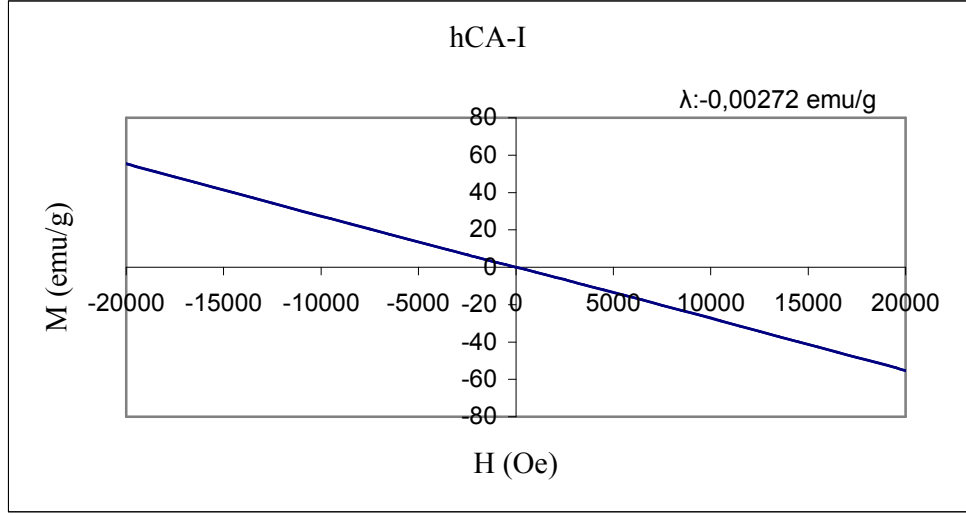
VSM'den elde edilen sonuçlar, manyetik momentin (m) manyetik alana (H) karşı grafiği olarak elde edilir. Daha sonra, manyetik moment değerleri, Eşitlik 1.1 kullanılarak, ölçülen örneğin kütlesine bölünerek, manyetizasyonun, manyetik alana göre grafikleri elde edildi. Elde edilen grafikler, Şekil 3.3-3.28'de verilmektedir. Bu şekillerin hepsi, örneklerimizin tamamının diyamanyetik özelliğe sahip olduğunu göstermektedir. Diyamanyetiklik oranının ne kadar değiştiğini görebilmek için; Eşitlik 1.2 kullanılarak manyetik alınganlık (λ) değeri hesaplanmıştır ve Tablo 3.1 de gösterilmektedir. Tablo 3.1'in değerlendirilmesi ışığında, manyetik alınganlık değerlerinin çok fazla değişmediği görülmektedir.



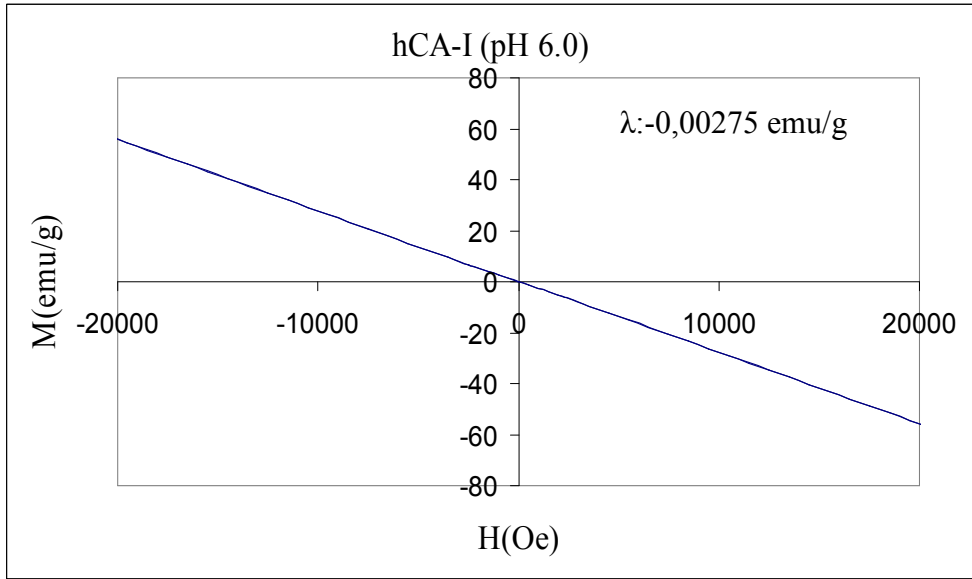
Şekil 3.3.Saf suyun VSM ile manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi



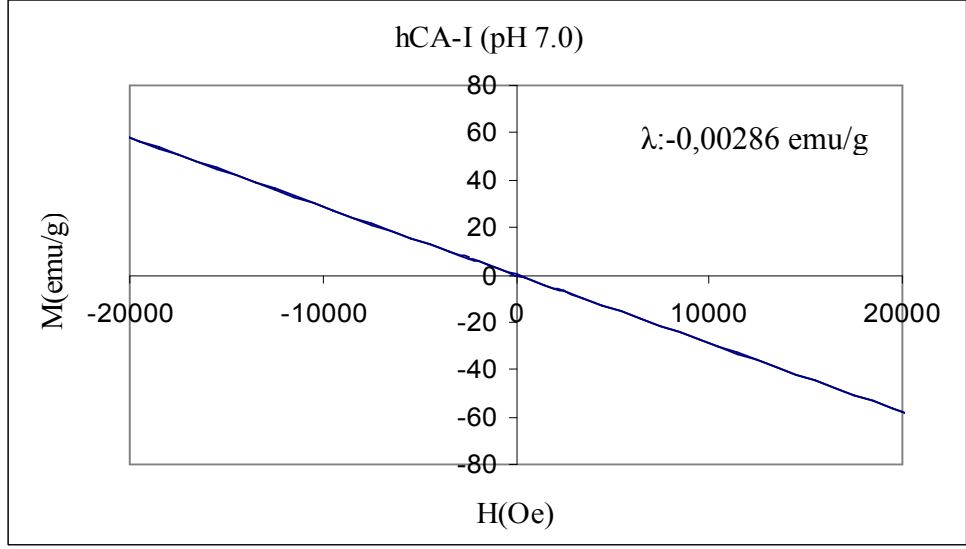
Şekil 3.4.Tris-SO₄ çözeltisinin VSM ile manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi



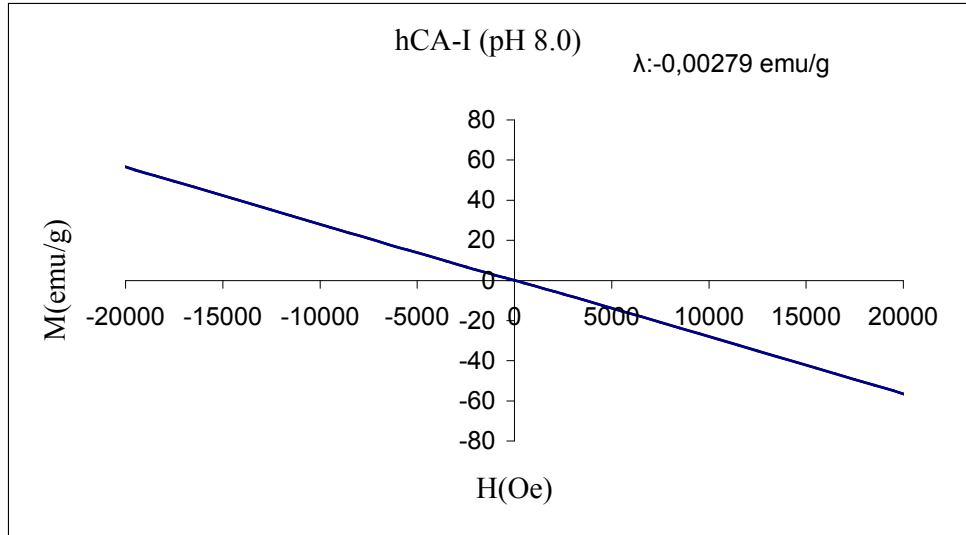
Şekil 3.5.hCA-I izoenzimin VSM ile manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi



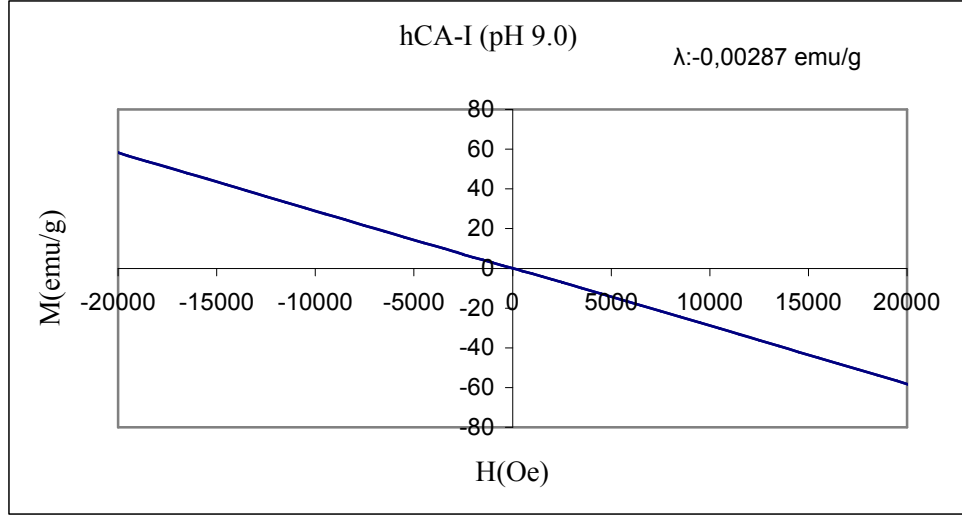
Şekil 3.6.pH:6 ortamındaki hCA-I izoenzimin VSM ile manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi



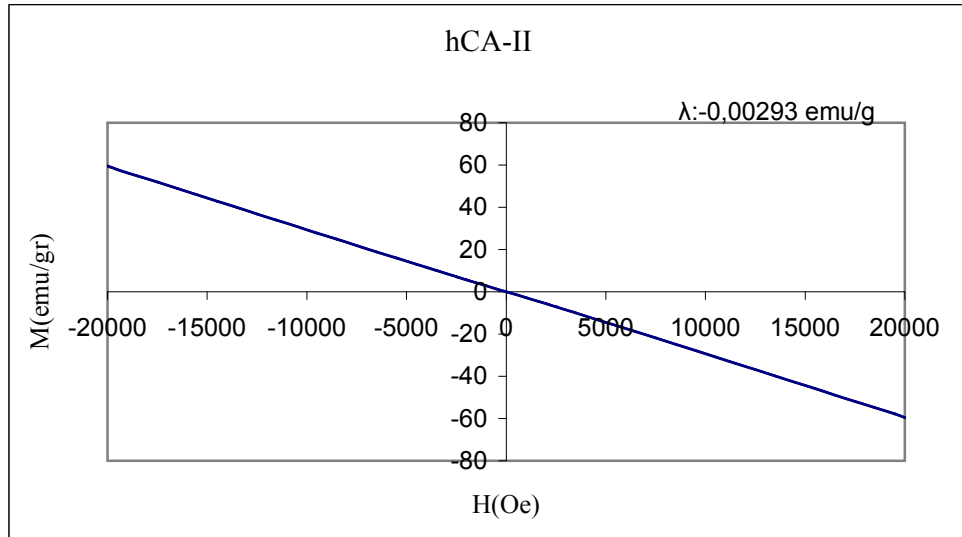
Şekil 3.7.pH:7 ortamındaki hCA-I izoenzimin VSM ile manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi



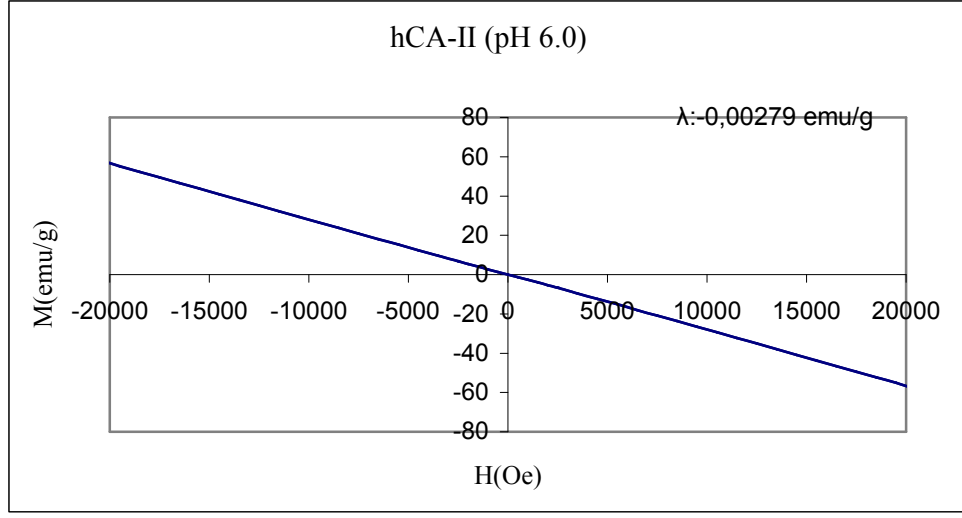
Şekil 3.8.pH:8 ortamındaki hCA-I izoenzimin VSM ile manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi



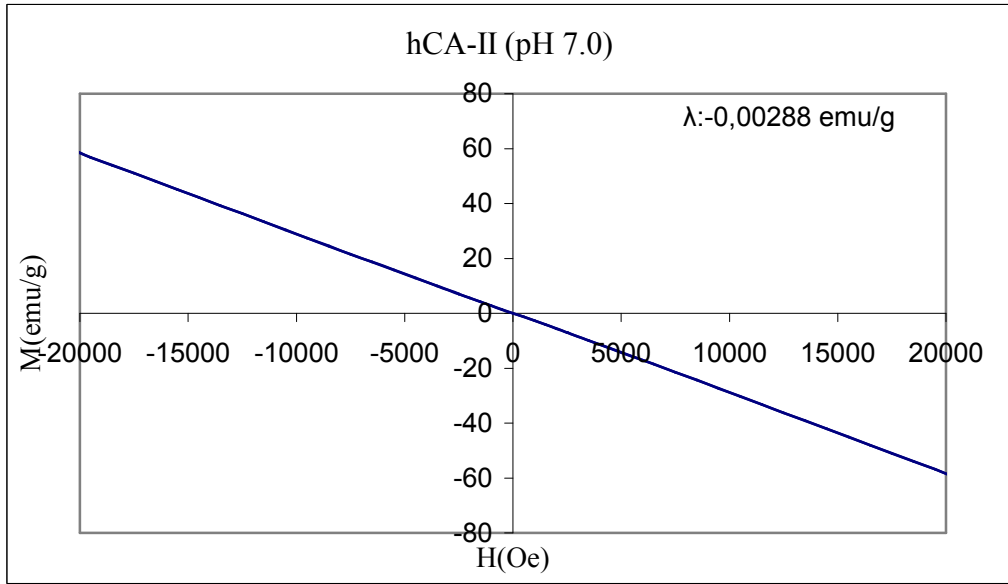
Şekil 3.9.pH:9 ortamındaki hCA-I izoenzimin VSM ile manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi



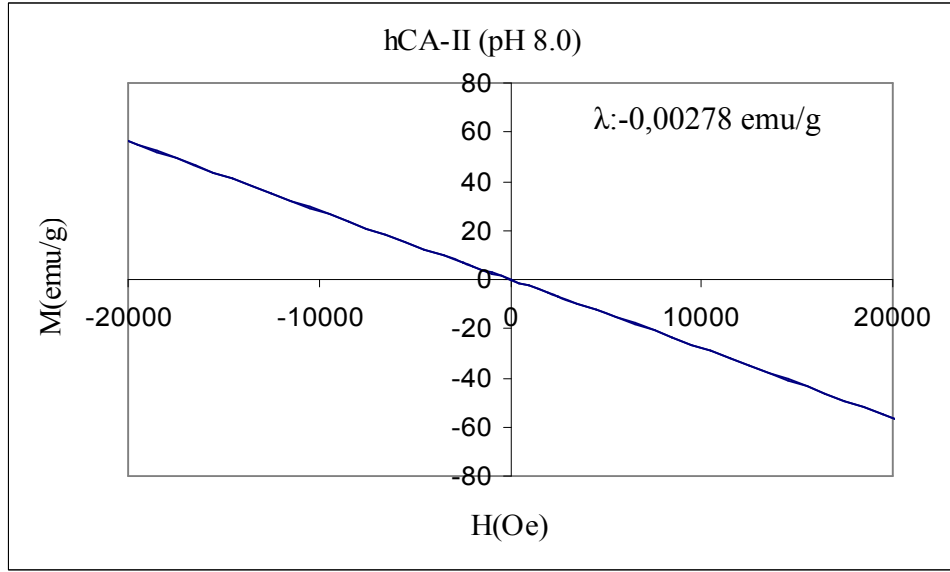
Şekil 3.10.hCA-II izoenzimin VSM ile manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi



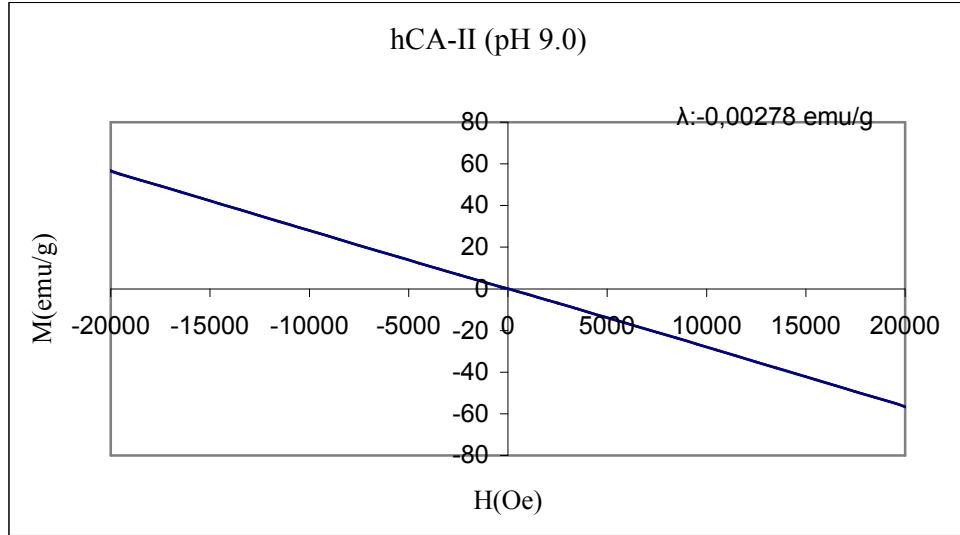
Şekil 3.11.pH:6 ortamındaki hCA-II izoenzimin VSM ile manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi



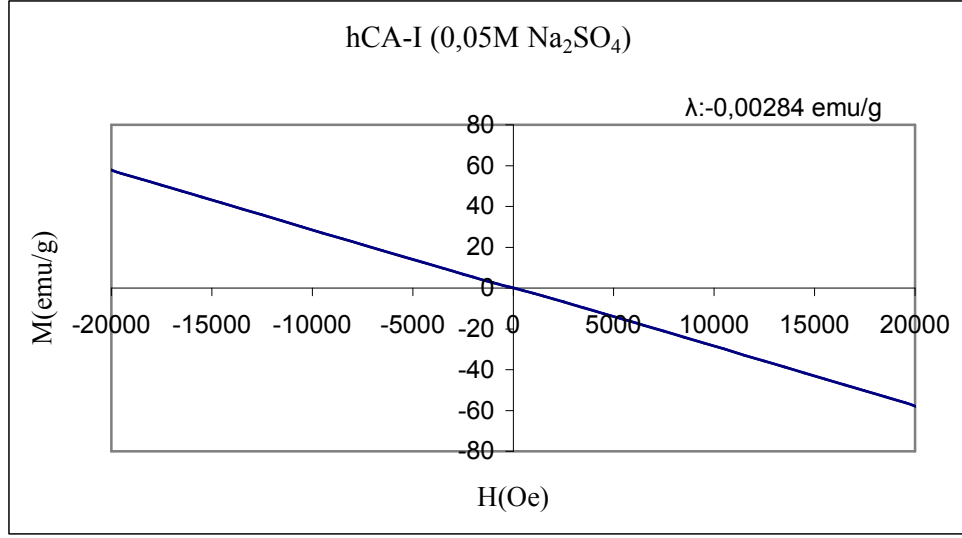
Şekil 3.12.pH:7 ortamındaki hCA-II izoenzimin VSM ile manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi



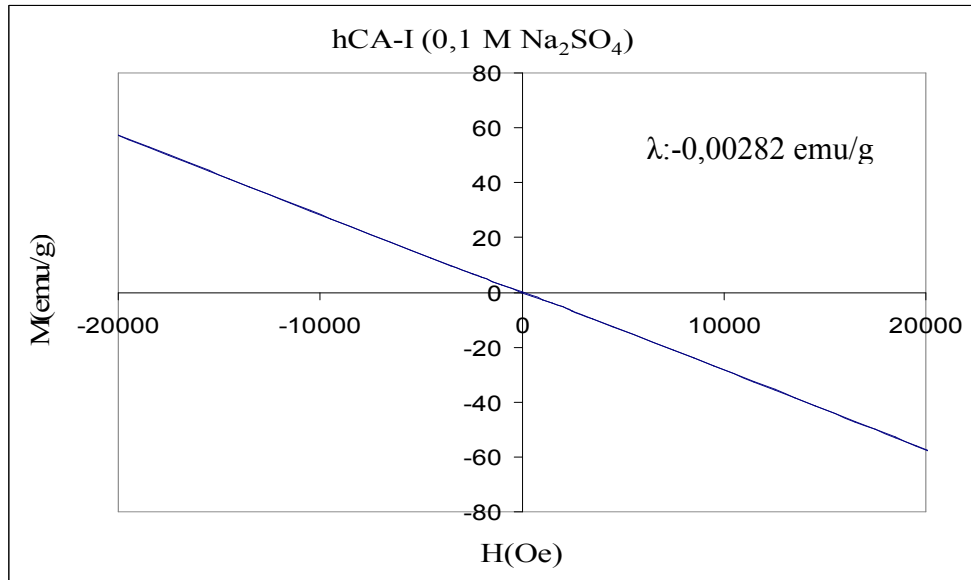
Şekil 3.13.pH:8 ortamındaki hCA-II izoenzimin VSM ile manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi



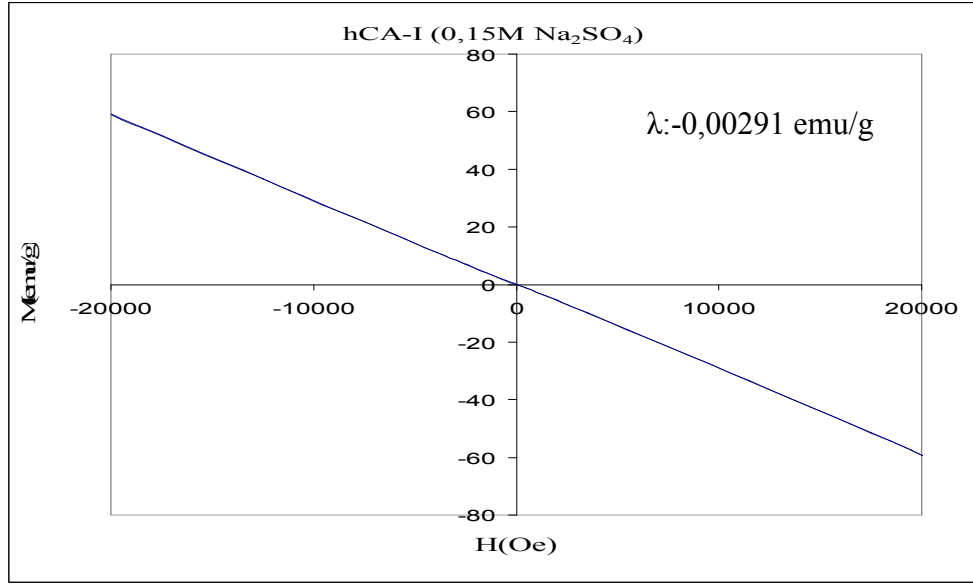
Şekil 3.14.pH:9 ortamındaki hCA-II izoenzimin VSM ile manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi



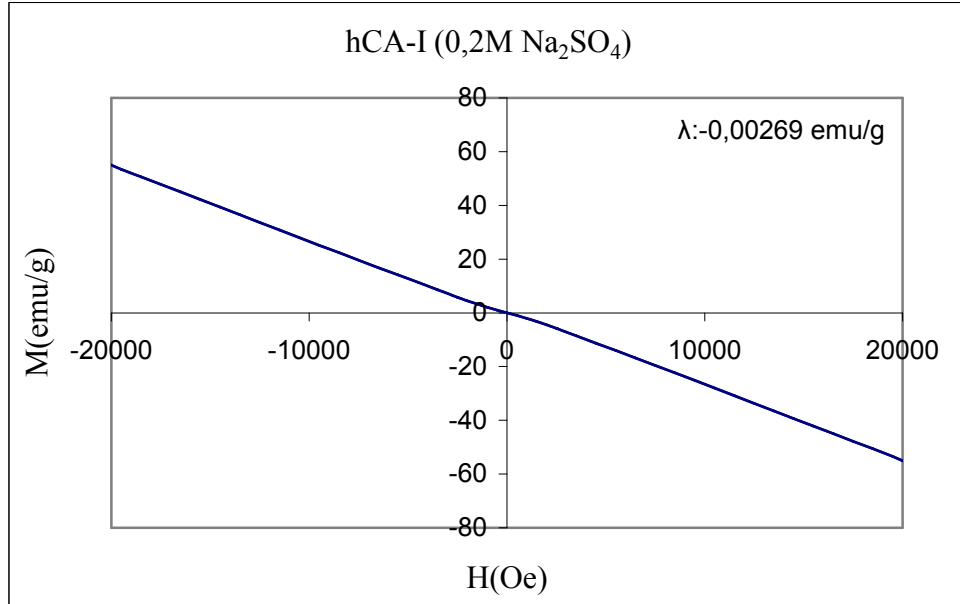
Şekil 3.15 0.05 M Na₂SO₄ içeren çözelti ortamındaki hCA-I izoenziminin manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi



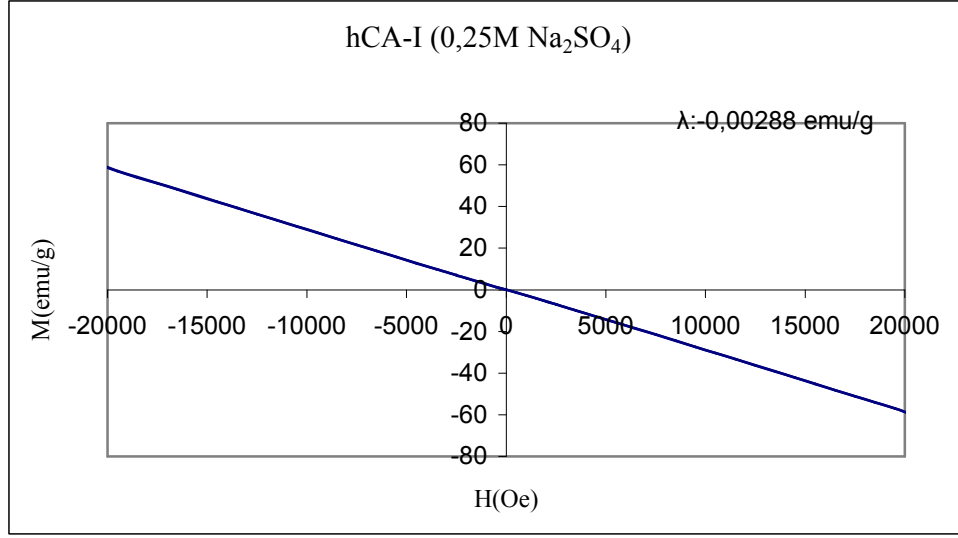
Şekil 3.16 0.1 M Na₂SO₄ içeren çözelti ortamındaki hCA-I izoenziminin manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi



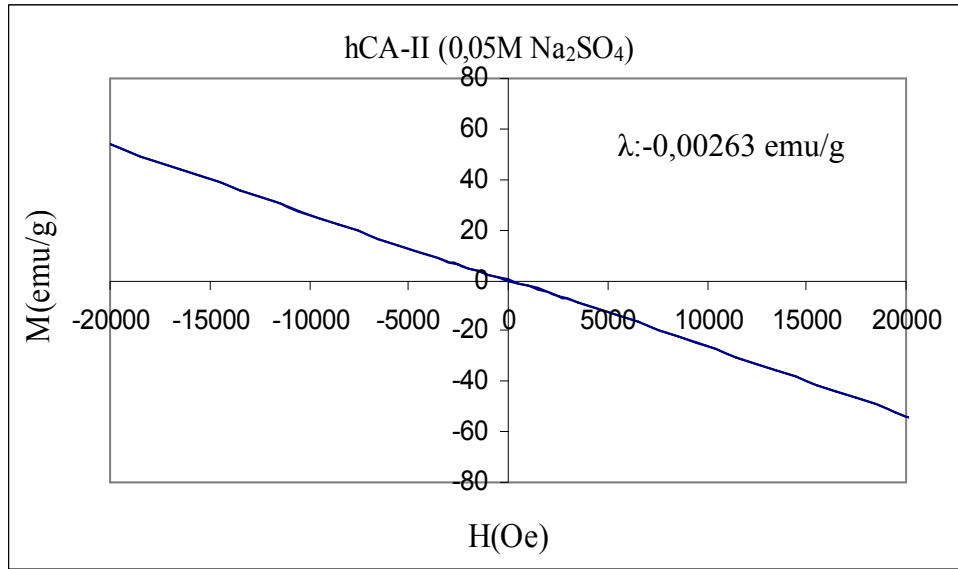
Şekil 3.17 0.15 M Na₂SO₄ içeren çözelti ortamındaki hCA-I izoenziminin manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi



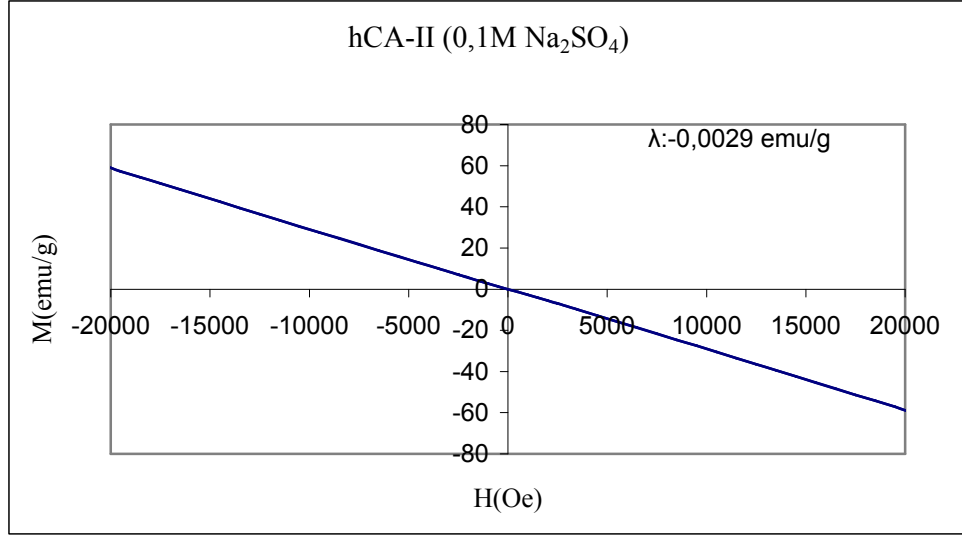
Şekil 3.18 0.2 M Na₂SO₄ içeren çözelti ortamındaki hCA-I izoenziminin manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi



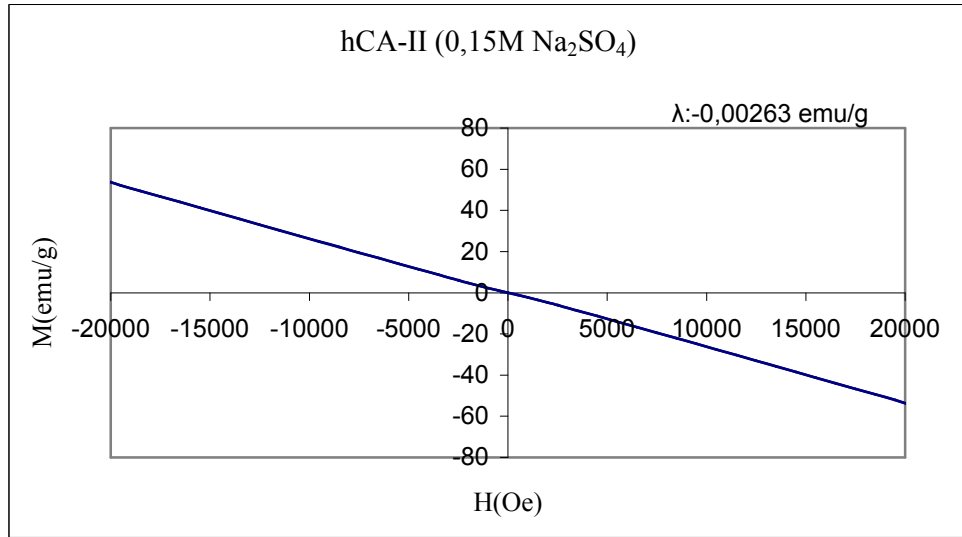
Şekil 3.19 0.25 M Na₂SO₄ içeren çözelti ortamındaki hCA-I izoenziminin manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi



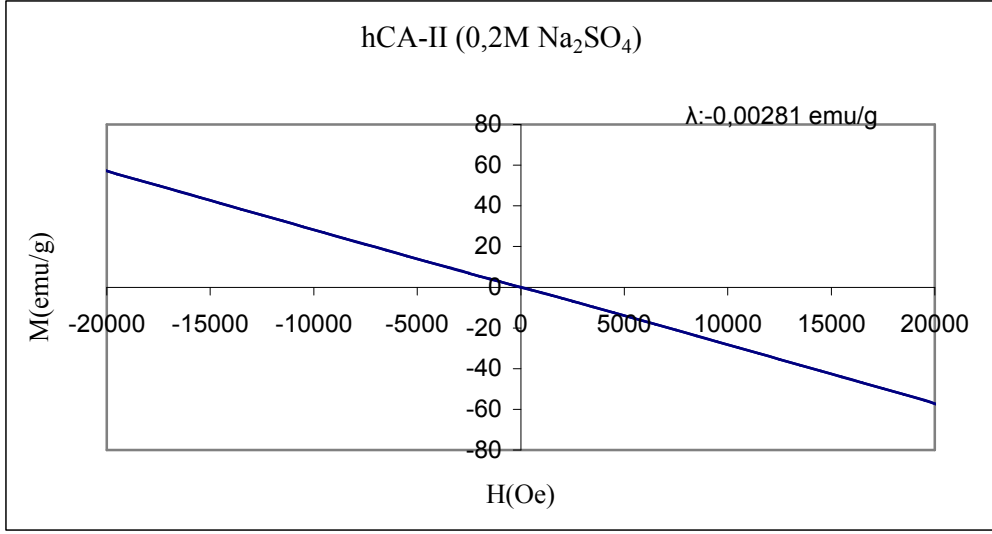
Şekil 3.20 0.05 M Na₂SO₄ içeren çözelti ortamındaki hCA-II izoenziminin manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi



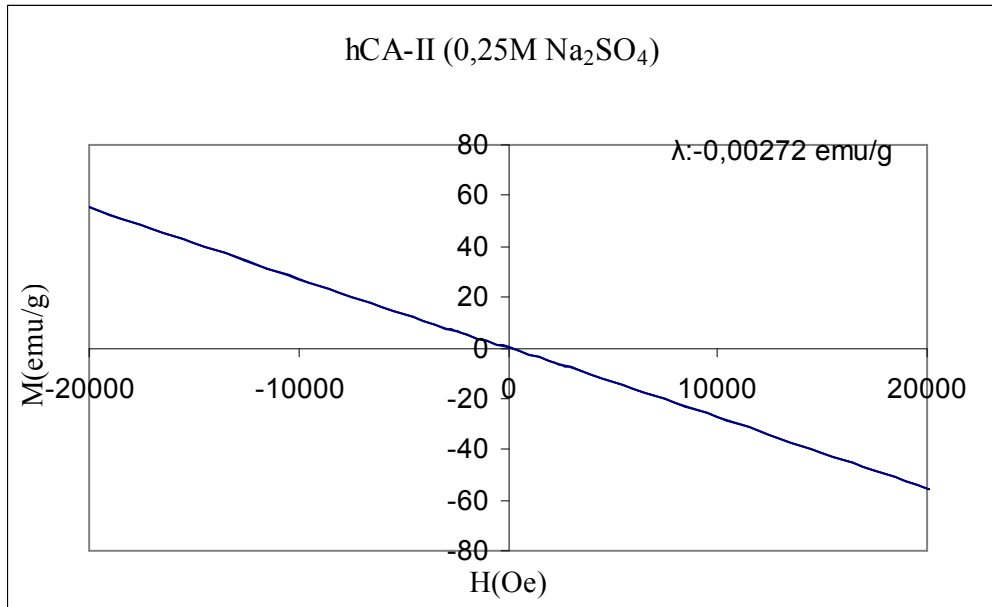
Şekil 3.21 0.1 M Na₂SO₄ içeren çözelti ortamındaki hCA-II izoenziminin manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi



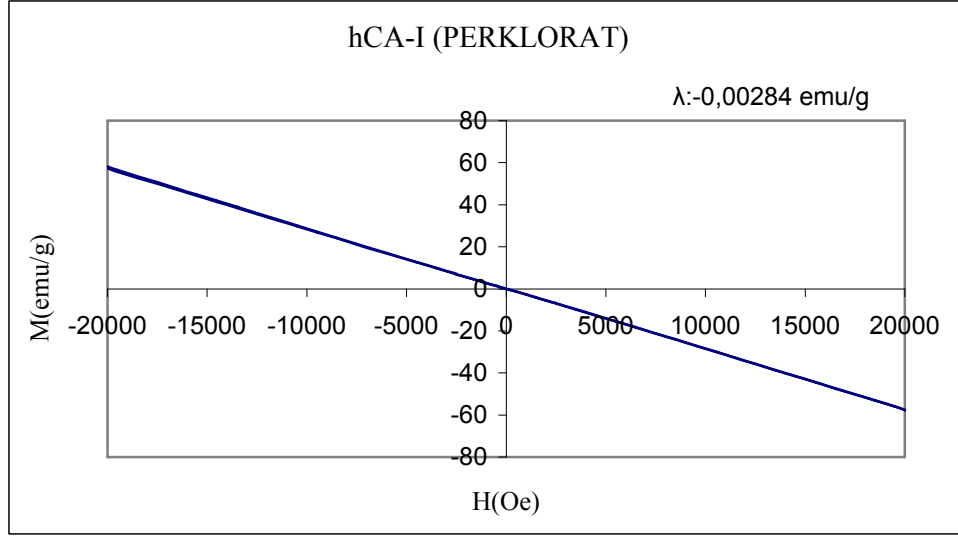
Şekil 3.22 0.15 M Na₂SO₄ içeren çözelti ortamındaki hCA-II izoenziminin manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi



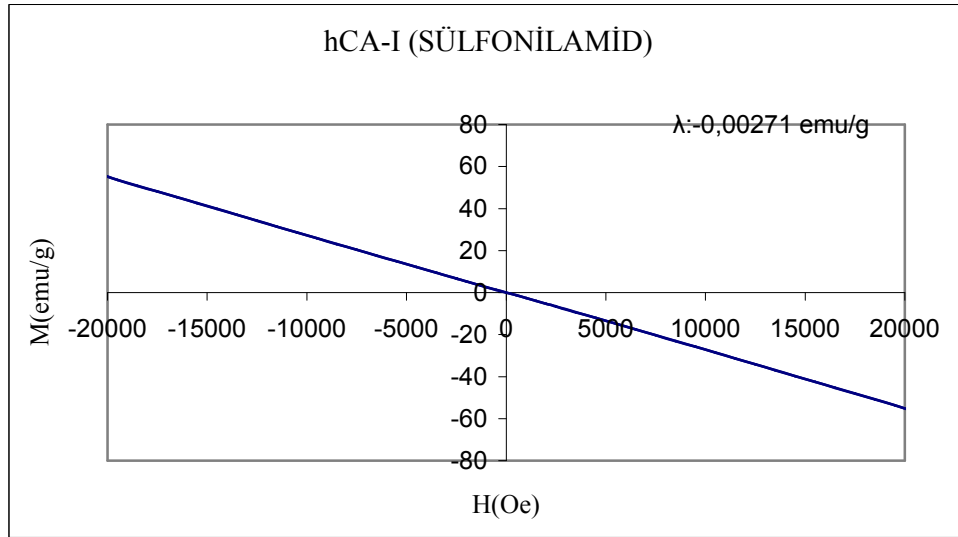
Şekil 3.23 0.2 M Na₂SO₄ içeren çözelti ortamındaki hCA-II izoenziminin manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi



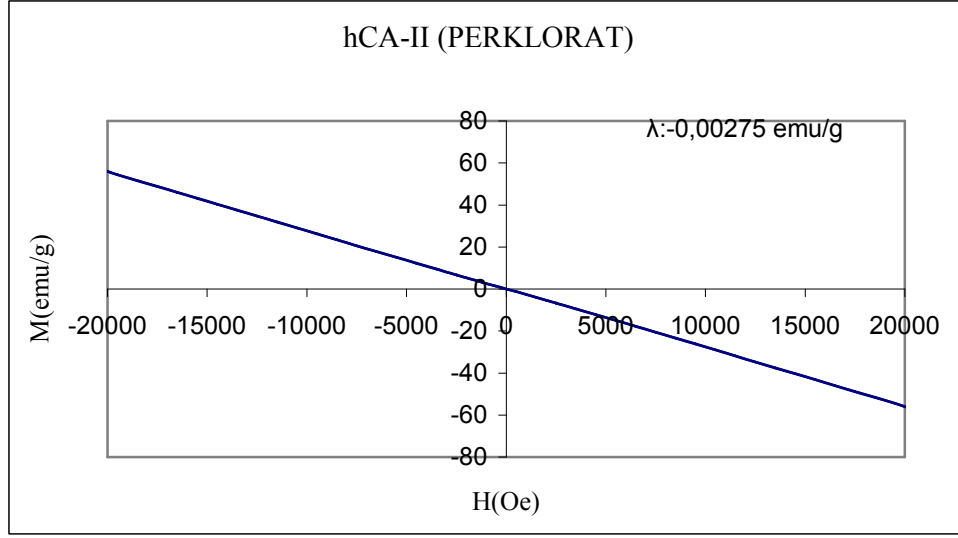
Şekil 3.24 0.25 M Na₂SO₄ içeren çözelti ortamındaki hCA-II izoenziminin manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi



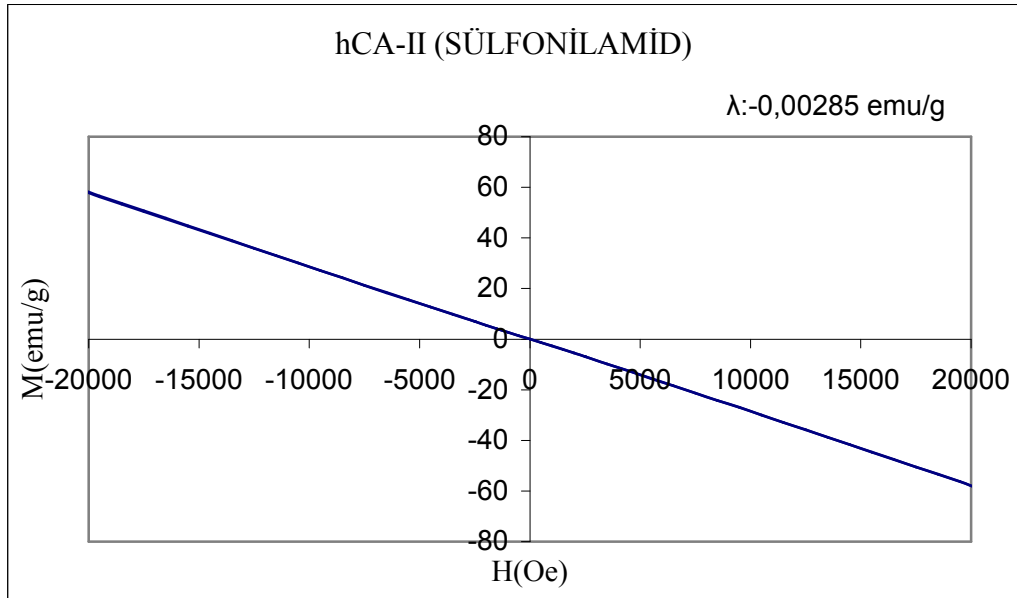
Şekil 3.25 Perklorat içeren çözelti ortamındaki hCA-I izoenziminin manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi



Şekil 3.26 Sülfonilamid içeren çözelti ortamındaki hCA-I izoenziminin manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi



Şekil 3.27 Perklorat içeren çözelti ortamındaki hCA-II izoenziminin manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi



Şekil 3.28 Sülfonilamid içeren çözelti ortamındaki hCA-II izoenziminin manyetizasyon özelliğinin belirlenmesi

Çizelge.3.1.Örneklerin kütleli Manyetik Alınganlıkları ($\lambda=M/H$)

Örnek Adı	Kütleli Manyetik Alınganlık (λ)
0,05 MTris-SO ₄	- 0,00273 emu/g
Saf su	- 0,00275 emu/g
hCA-I	- 0,00272 emu/g
hCA-I (pH 6)	- 0,00275 emu/g
hCA-I (pH 7)	- 0,00286 emu/g
hCA-I (pH 8)	- 0,00279 emu/g
hCA-I (pH 9)	- 0,00287 emu/g
hCA-I (0,05 M Na ₂ SO ₄)	- 0,00284 emu/g
hCA-I (0,1 M Na ₂ SO ₄)	- 0,00282 emu/g
hCA-I (0,15 M Na ₂ SO ₄)	- 0,00291 emu/g
hCA-I (0,2 M Na ₂ SO ₄)	- 0,00269 emu/g
hCA-I (0,25 M Na ₂ SO ₄)	- 0,00288 emu/g
hCA-I (perklorat)	- 0,00284 emu/g
hCA-I (sülfonilamid)	- 0,00271 emu/g
hCA-II (pH 6)	- 0,00279 emu/g
hCA-II (pH 7)	- 0,00288 emu/g
hCA-II (pH 8)	- 0,00278 emu/g
hCA-II (pH 9)	- 0,00278 emu/g
hCA-II	- 0,00293 emu/g
hCA-II (0,05 M Na ₂ SO ₄)	- 0,00263 emu/g
hCA-II (0,1 M Na ₂ SO ₄)	- 0,00290 emu/g
hCA-II (0,15 M Na ₂ SO ₄)	- 0,00263 emu/g
hCA-II (0,2 M Na ₂ SO ₄)	- 0,00281 emu/g
hCA-II (0,25 M Na ₂ SO ₄)	- 0,00272 emu/g
hCA-II (perklorat)	- 0,00275 emu/g
hCA-II (sülfonilamid)	- 0,00285 emu/g

3.5. Manyetik alanın izoenzimler üzerindeki etkisi

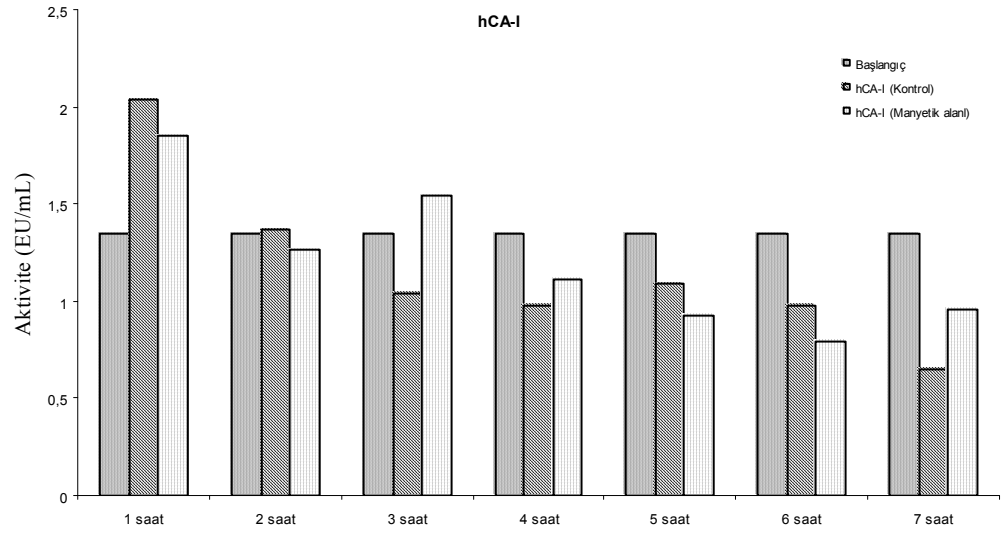
hCA-I ve hCA-II izoenzimleri bölüm 3.1’de anlatıldığı gibi saf olarak elde edilmiştir. Söz konusu izoenzimler daha sonra çeşitli şekillerde manyetik alana maruz bırakılmıştır. Her bir uygulama sırasında manyetik alanda bulunan enzimlerin, kontrol grubunda aynı koşullarda fakat manyetik alansız ortamda bekletilmiştir. Daha sonra kontrol gruplarının ve manyetik alanda bekletilmiş enzimlerin aktivitelerindeki değişiklikler karşılaştırılmış ve ilgili bölümlerde grafik olarak verilmiştir.

3.5.1. Sabit manyetik alanda farklı sürelerde, manyetik alanın izoenzimler üzerindeki etkisi

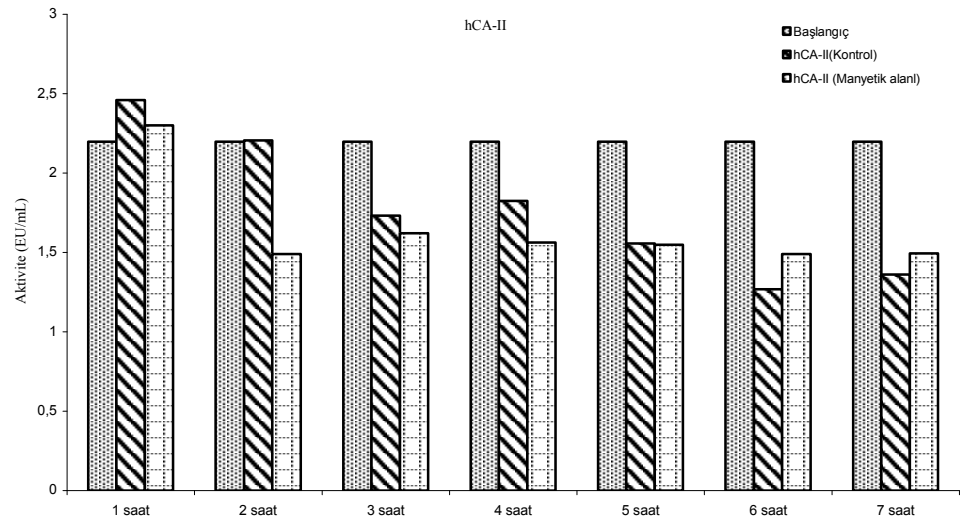
Bölüm 2.2.4.1’de anlatıldığı gibi hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin 10000 Oe şiddetindeki manyetik alan uygulaması ile aktivitede meydana gelen değişiklikler çizelge 3.1’de verilmiştir. Ayrıca sabit manyetik alanda zamanla aktivitede meydana gelen değişimler grafik olarak şekil 3.29 ve 3.30’da gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 10000 Oe manyetik alan şiddetine farklı zaman aralıklarında maruz bırakılmış hCA-I, hCA-II izoenzimleri ve kontrol grubu aktiviteleri.

	Aktivite (EU/mL) [(t ₀)(t _c)]/(t _c)							
	Başlangıç	1 saat	2 saat	3 saat	4saat	5saat	6saat	7saat
Kontrol	1,34	2,02	1,35	0,98	0,94	0,99	1,02	0,68
		2,05	1,39	1,10	1,01	1,17	0,93	0,62
Manyetik alanda hCA-I	1,34	1,94	1,11	1,50	1,03	0,92	0,82	1,10
		1,77	1,41	1,58	1,18	0,93	0,77	0,89
Kontrol	2,19	2,52	2,06	1,79	1,77	1,55	1,38	1,42
		2,39	2,34	1,74	1,86	1,56	1,15	1,29
Manyetik alanda hCA-II	2,19	2,49	1,52	1,66	1,57	1,64	1,41	1,46
		2,10	1,45	1,57	1,55	1,45	1,56	1,52



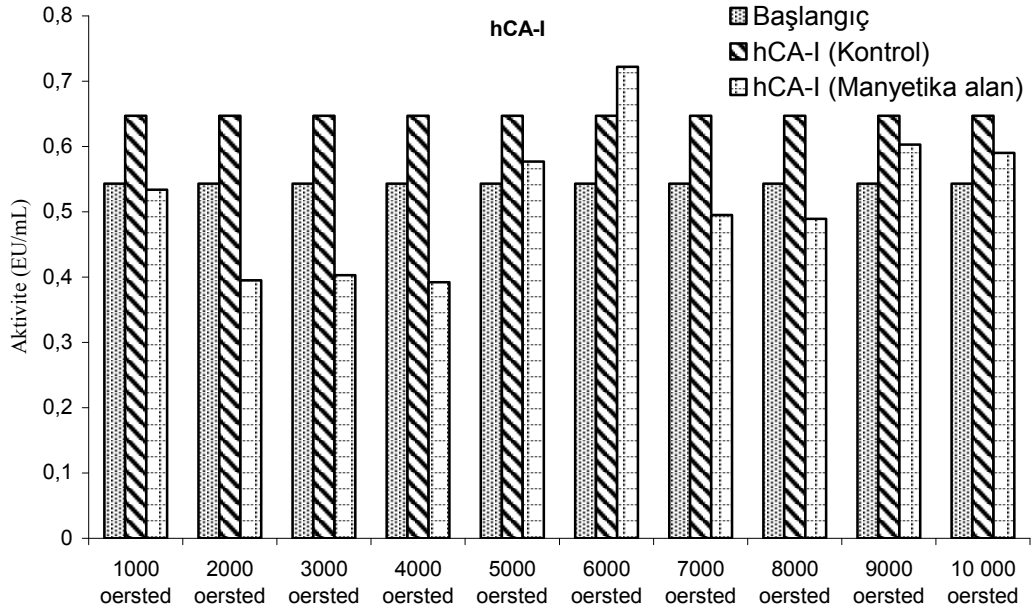
Şekil.3.29 10000 Oe manyetik alan şiddetine maruz bırakılmış hCA-I izoenzimi ve kontrol grubu aktivitelerinin zamana bağlı değişimi.



Şekil 3.30 10000 Oe manyetik alan şiddetine maruz bırakılmış hCA-II izoenzimi ve kontrol grubu aktivitelerinin zamana bağlı değişimi.

3.5.2. Farklı şiddette ve sabit zaman aralıklarında, manyetik alanın izoenzimler üzerindeki etkisi

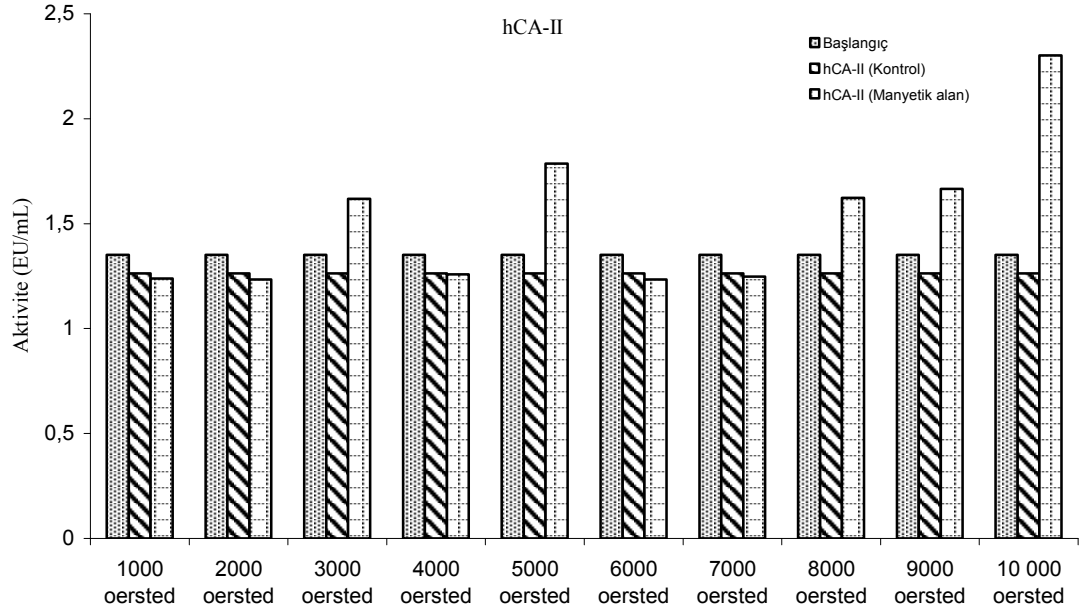
Farklı şiddetteki manyetik alanın söz konusu izoenzimler üzerindeki etkisini araştırmak için 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000 Oe manyetik alan şiddetleri kullanıldı. hCA-I ve hCA-II izoenzimleri üzerine manyetik alan uygulama sonuçları çizelge 3.2.'de ve şekil 3.31 ve 3.32'de verilmiştir.



Şekil 3.31 Farklı manyetik alan şiddetlerine maruz bırakılmış hCA-I izoenzimi ve kontrol grubunun aktivitelerindeki 1 saat içerisinde gözlenen değişim.

Çizelge 3.3 Farklı manyetik alan şiddetlerine maruz bırakılmış hCA-I, hCA II izoenzimleri ve kontrol grubunun 1 saat sonundaki aktiviteleri.

		Aktivite (EU/mL) [(t ₀)(t _c)]/(t _c)									
	Başlangıç	1000 oersted	2000 oersted	3000 oersted	4000 oersted	5000 oersted	6000 oersted	7000 oersted	8000 oersted	9000 oersted	10 000 oersted
Kontrol	0,54	0,64									
		0,65									
Manyetik alandan hCA-I	0,54	0,44	0,37	0,46	0,37	0,59	0,72	0,48	0,47	0,59	0,78
		0,62	0,41	0,33	0,40	0,56	0,81	0,50	0,49	0,61	0,71
Kontrol	1,35	1,26									
		1,27									
Manyetik alandan hCA-II	1,35	1,21	1,28	1,63	1,30	1,82	1,24	1,22	1,48	1,68	1,54
		1,25	1,18	1,59	1,20	1,75	1,22	1,27	1,76	1,65	1,29



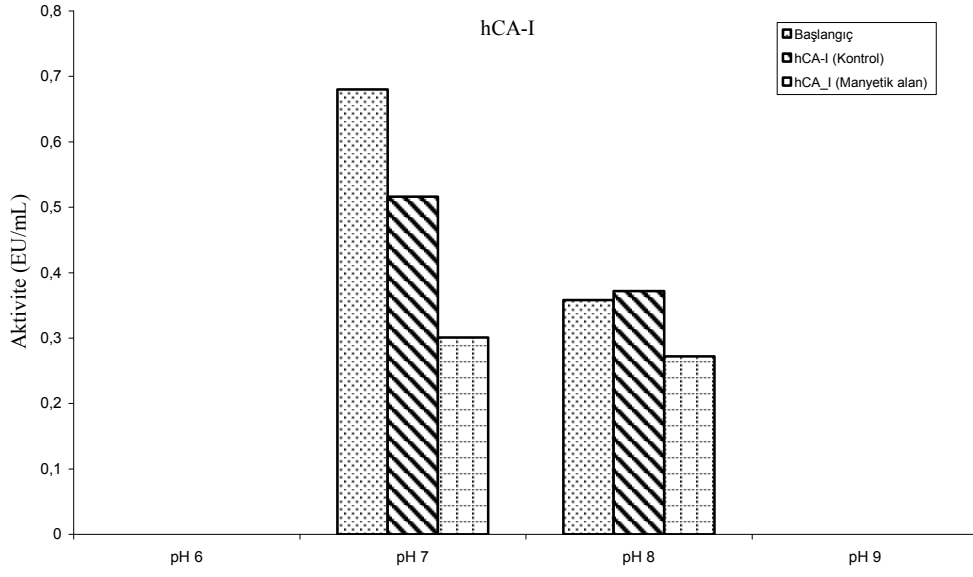
Şekil 3.32 Farklı manyetik alan şiddetlerine maruz bırakılmış hCA-II izoenzimi ve kontrol grubunun aktivitelerindeki 1 saat içerisinde gözlenen değişim

3.5.3. Sabit manyetik alanın farklı pH'larda izoenziler üzerindeki etkisi

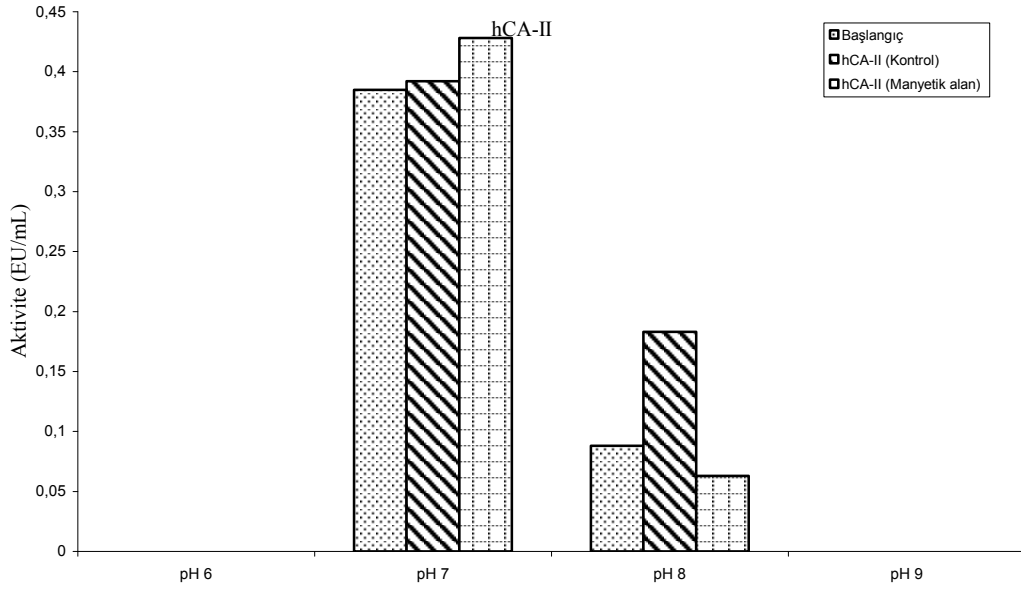
Manyetik alanın farklı pH değerlerindeki enzim üzerindeki etkisini belirlemek için bölüm 2.2.4.3.'de anlatıldığı gibi hazırlanan enzim çözeltileri 10 000 Oe şiddetinde manyetik alana bırakılmıştır. Sonuçlar çizelge 3.3 ve şekil 3.33 ve 3.34'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4 10000 Oe manyetik alan şiddetine maruz bırakılmış farklı pH'lardaki hCA-I, hCA-II ve kontrol grubunun 1 saat sonundaki aktiviteleri.

	Aktivite (EU/mL) [(t ₀)(t _c)]/(t _c)			
	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
Başlangıç	Aktivite yok	0,68	0,35	Aktivite yok
Kontrol		0,51	0,39	
Manyetik alanda hCA-I		0,52	0,35	
		0,30	0,29	
		0,31	0,29	
Başlangıç	Aktivite yok	0,38	0,08	Aktivite yok
Kontrol		0,39	0,18	
Manyetik alanda hCA-II		0,38	0,18	
		0,42	0,08	
		0,42	0,04	



Şekil 3.33.10000 Oe manyetik alan şiddetine maruz bırakılmış farklı pH'lardaki hCA-I ve kontrol grubunun aktivitelerindeki 1 saatlik değişim.



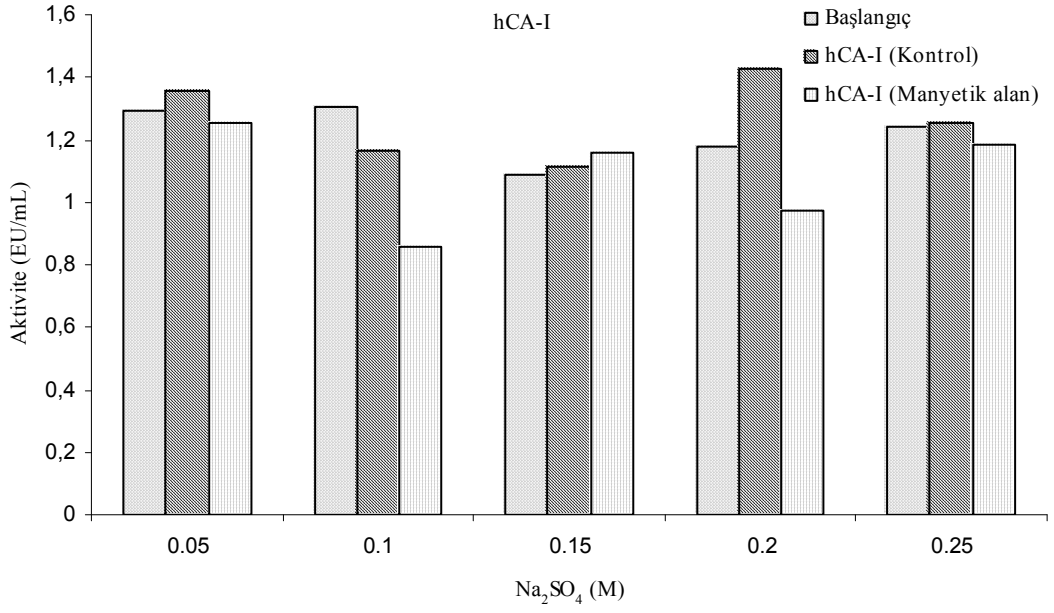
Şekil 3.34 10000 Oe manyetik alan şiddetine maruz bırakılmış farklı pH'lardaki hCA-II ve kontrol grubunun aktivitelerindeki 1 saatlik değişim.

3.5.4. Sabit manyetik alanın farklı iyonik şiddetlerdeki izoenzimler üzerine etkisi

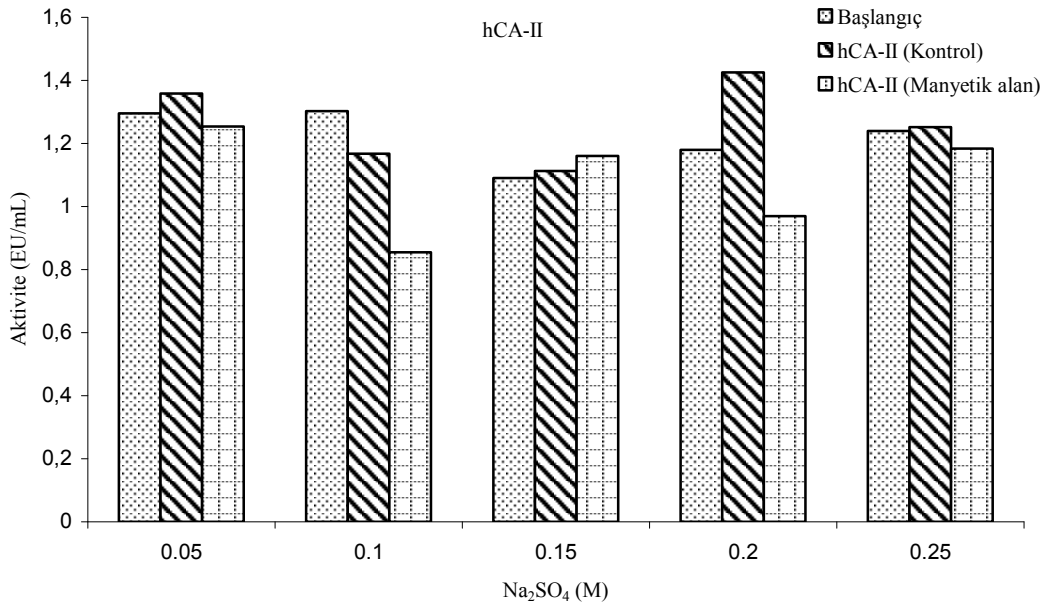
Farklı şiddette iyon konsantrasyonuna sahip saf enzim çözeltileri hazırlandı. Söz konusu enzim çözeltileri 1 saat süre ile 10 000 Oe manyetik alan şiddetinde bekletilerek aktiviteleri belirlendi. Bulgular çizelge 3.4. ve şekil 3.35 ve 3.36'da verilmiştir.

Çizelge 3.5 10000 Oe manyetik alan şiddetine maruz bırakılmış hCA-I, hCA-II izoenzimleri ve kontrol grubunun farklı iyon konsantrasyonlarında 1 saat sonraki aktiviteleri.

	Aktivite (EU/mL) $[(t_0)(t_c)]/(t_c)$				
	0,05 M	0,10 M	0,15 M	0,20 M	0,25 M
Başlangıç	0,260	0,275	0,129	0,056	0,106
	0,266	0,224	0,111	0,071	0,149
Kontrol	0,190	0,140	0,085	0,185	0,117
	0,176	0,179	0,098	0,191	0,119
Manyetik alanda hCA-I	0,144	0,232	0,096	0,235	0,099
	0,135	0,222	0,118	0,202	0,129
Başlangıç	1,363	1,300	1,112	1,151	1,240
	1,228	1,306	1,069	1,209	1,241
Kontrol	1,343	1,191	1,109	1,517	1,251
	1,374	1,145	1,117	1,333	1,254
Manyetik alanda hCA-II	1,233	0,880	1,215	0,995	1,155
	1,276	0,830	1,105	0,945	1,214



Şekil 3.35. 10000 Oe manyetik alan şiddetine maruz bırakılmış farklı iyonik şiddet içeren hCA-I ve kontrol grubunun aktivitelerinin 1 saat sonundaki değişimi.



Şekil 3.36 10000 Oe manyetik alan şiddetine maruz bırakılmış farklı iyonik şiddet içeren hCA-II ve kontrol grubunun aktivitelerinin 1 saat sonundaki değişimi

3.5.5 Sabit manyetik alanın inhibitör içeren izoenzimler üzerindeki etkisi

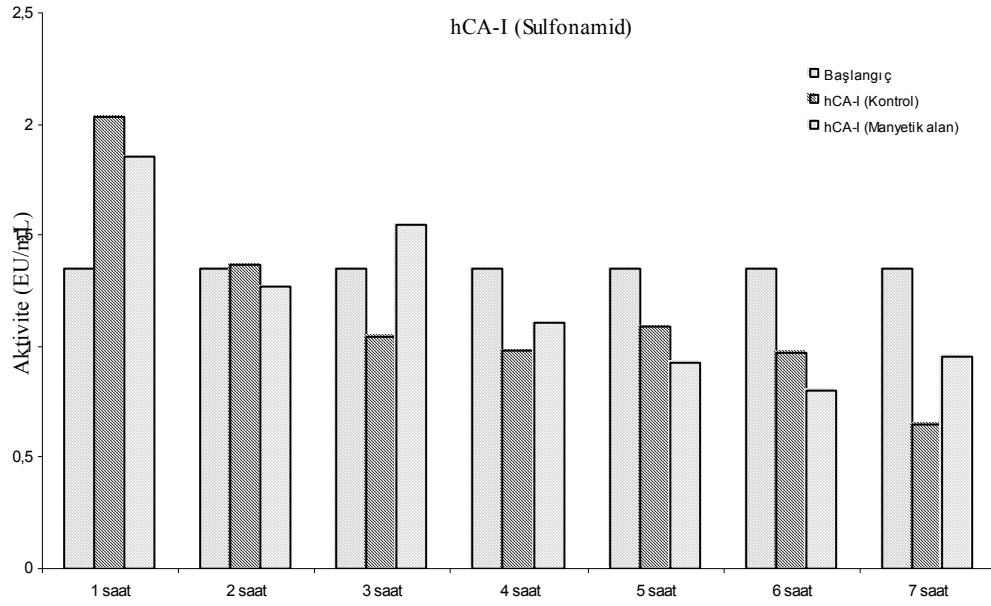
Söz konusu saf izoenzimlerin inhibisyonu üzerine manyetik alanın etkisini belirlemek için bölüm 2.2.4.5.'de anlatıldığı gibi hCA-I ve hCA-II izoenzimlerinin bilinen iki farklı inhibitörü olan sülfonilamid ve perklorat kullanıldı. Sonuçlar çizelge 3.5 ve 3.6, şekil 3.37, 3.38, 3.39 ve 3.40'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.6 10000 Oe manyetik alan şiddetine maruz bırakılmış sülfonamid içeren hCA-I, hCA-II ve kontrol grubunun 1 saat sonundaki aktiviteleri..

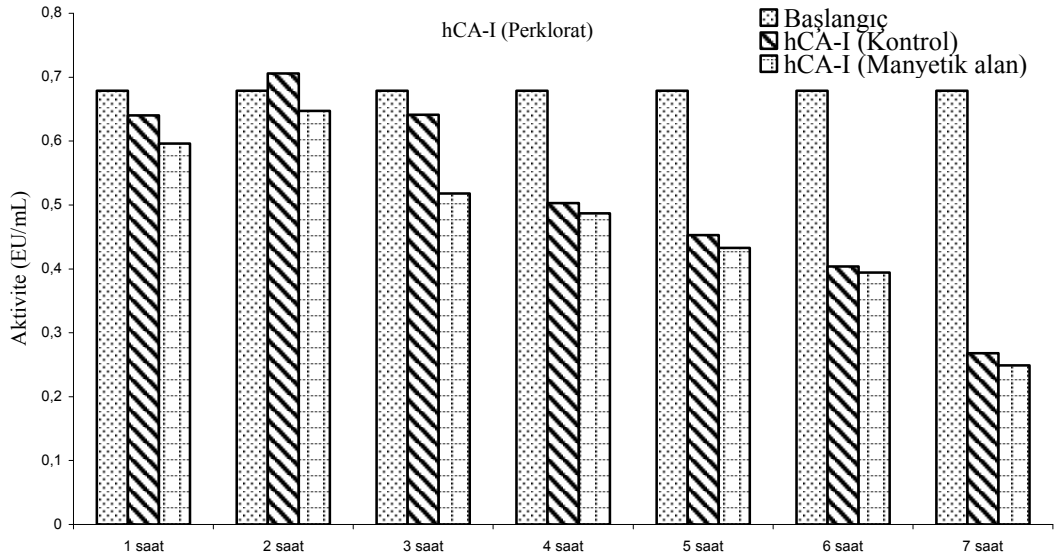
		Aktivite (EU/mL) [(t ₀)(t _c)]/(t _c)						
		Sulfonamid						
	Başlangıç	1 saat	2 saat	3 saat	4saat	5saat	6saat	7saat
Kontrol	0,593	0,476	0,650	0,650	0,645	0,482	0,618	0,692
		0,500	0,707	0,665	0,620	0,536	0,697	0,772
Manyetik alanda hCA-I	0,593	0,629	0,632	0,557	0,534	0,586	0,427	0,415
		0,733	0,670	0,587	0,486	0,601	0,587	0,489
Kontrol	0,983	0,981	0,402	0,515	0,433	0,500	0,411	0,645
		0,965	0,435	0,522	0,369	0,554	0,446	0,500
Manyetik alanda hCA-II	0,963	0,736	0,452	0,490	0,446	0,192	0,295	0,376
		0,718	0,469	0,476	0,456	0,198	0,399	0,433

Çizelge 3.7 10000 Oe manyetik alan şiddetine maruz bırakılmış perklorat içeren hCA-I, hCA-II ve kontrol grubunun 1 saat sonundaki aktiviteleri..

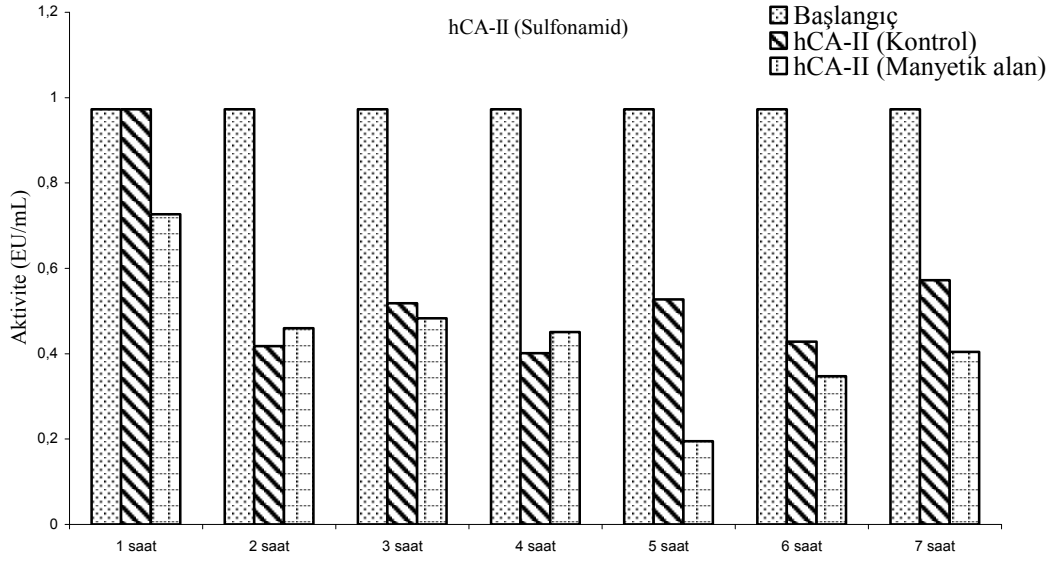
		Aktivite (EU/mL) [(t ₀)(t _c)]/(t _c)						
		Perklorat						
	Başlangıç	1 saat	2 saat	3 saat	4saat	5saat	6saat	7saat
Kontrol	0,679	0,623	0,700	0,635	0,509	0,446	0,451	0,281
		0,658	0,712	0,648	0,497	0,461	0,357	0,256
Manyetik alanda hCA-I	0,679	0,576	0,642	0,559	0,489	0,446	0,394	0,250
		0,616	0,653	0,478	0,486	0,420	0,395	0,249
Kontrol	0,973	1,751	1,478	1,889	1,703	1,985	1,694	1,435
		1,815	1,465	1,734	1,843	2,125	1,836	1,493
Manyetik alanda hCA-II	0,973	1,503	1,475	1,658	1,450	1,792	1,735	1,461
		1,522	1,515	1,426	1,712	1,867	1,596	1,424



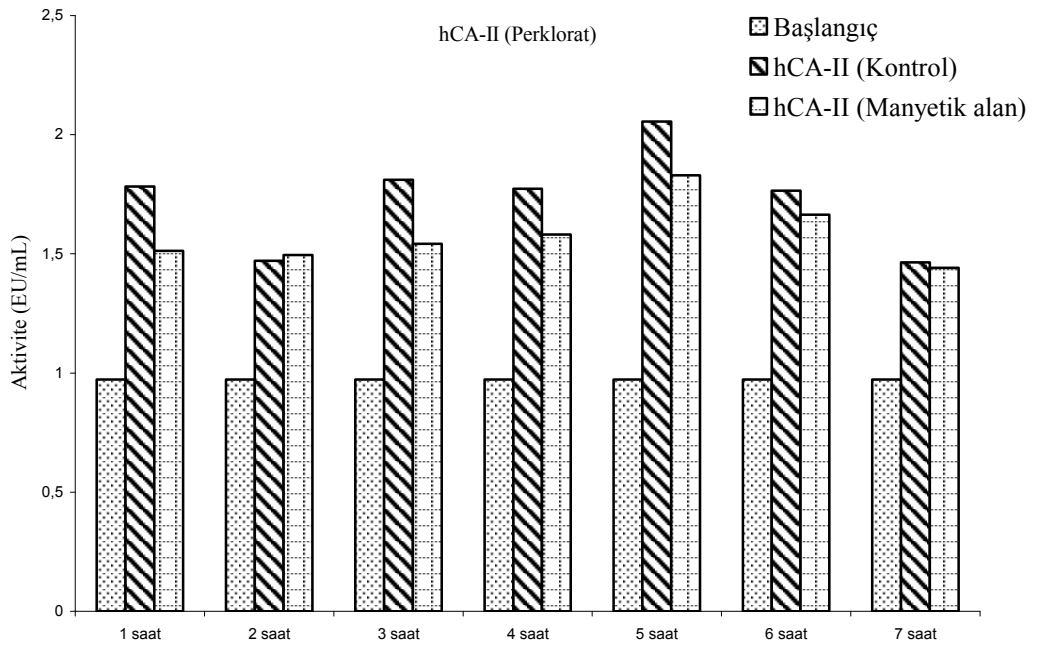
Şekil 3.37 10000 Oe manyetik alan şiddetine maruz bırakılmış sülfonamid içeren hCA-I ve kontrol grubunun aktivitelerindeki 1 saatlik değişim.



Şekil 3.38 10000 Oe manyetik alan şiddetine maruz bırakılmış perklorat içeren hCA-I ve kontrol grubunun aktivitelerindeki 1 saatlik değişim.



Şekil 3.39 10000 Oe manyetik alan şiddetine maruz bırakılmış sülfonamid içeren hCA-II ve kontrol grubunun aktivitelerindeki 1 saatlik değişim.



Şekil 3.40. 10000 Oe manyetik alan şiddetine maruz bırakılmış perklorat içeren hCA-II ve kontrol grubunun aktivitelerindeki 1 saatlik değişimi.

4.TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada manyetik alanın hCA izoenzimleri üzerinde etkileri incelenmiştir. Bu amaçla farklı manyetik alan şiddetleri, farklı iyonik şiddetler, farklı pH aralıkları ve farklı inhibitörler kullanılmıştır. Ayrıca, örneklerin tamamının manyetik özellikleri ölçülmüştür.

Karbonik anhidraz enzimleri canlılarda CO₂ molekülünün hidratasyonunu ve HCO₃⁻ iyonunun dehidratasyonunu katalizleyen Zn⁺² iyonu içeren bir metaloenzimdir. Son 20 yıldır CA enzimini katalitik mekanizmasını aydınlatmayı amaçlayan çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarla elde edilen sonuçlara göre, CA enziminin metabolizmada son derece önemli görevleri olması, çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesini kaybetmeden uzun süre saklanabilmesi gibi avantajlı özelliklere sahip olduğu anlaşılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu Karbonik Anhidraz enziminin, genel olarak metabolik CO₂ transportunu sağlamanın yanı sıra, birçok dokuda H⁺ ve HCO₃⁻ iyonlarının birikimini sağlayarak, vücut sıvılarının dengelerinin kurulmasında rolü olduğu ortaya çıkartılmıştır [1-16]

Araştırmamızda kullandığımız karbonik anhidraz enzimi insan eritrositlerinden afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmıştır. Bu amaçla tarafımızdan Sepharose-4B-L-tirozin-p-aminobenzosülfonamid kimyasal yapısına sahip jel sentezlenmiştir.

Afinite jeli, Sepharose 4B katı destek materyali üzerinde hazırlanmıştır. Sepharose 4B'nin serbest -OH grupları literatürde daha çok CNBr ile aktifleştirilmiştir. Bu çalışmada da aynı yöntem kullanılarak Sepharose 4B afinite jelinin CNBr ile aktifleştirilmesinden sonra, tirozin kovalent olarak bağlandı. Daha sonra sülfonamid diazolanarak L-tirozine kenetlendirildi. Burada afinite jelinin; uzantı kolunu L-tirozin, enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını da sülfonilamid

oluşturur. Sülfonilamid karbonik anhidraz enziminin spesifik bir inhibitörüdür. Afinite jelinin yapısına girerek CA enziminin yüksek oranda saflaştırılmasında başarı ile kullanılmıştır [14]. Söz konusu jel kullanılarak hCA-I ve hCA-II izoenzimleri direkt hemolizattan saflaştırılmıştır. Bu amaçla hCA-I izoenziminin elüsyonu için; 1 M NaCl / 22 mM Na₂HPO₄ (pH=6,3), hCA-II için ise 0.1 M NaCH₃COO / 0.5 M NaClO₄ (pH 5.6) elüsyon tamponları kullanılmıştır. Enzimlerin saflığı SDS-PAGE uygulanarak kontrol edilmiştir [39].

hCA-I ve hCA-II izoenzimleri için tek bantlar elde edilmiştir. Yaklaşık molekül ağırlıkları 30 kDa ağırlığında bulunmuştur. Bu değerlerin literatürle uyum halinde olduğu tespit edilmiştir [67].

Karbonik anhidrazın aktivite tayini, CO₂-Hidrataz adı verilen, Maren ve arkadaşlarının modifiye ettikleri Wilbur-Anderson yöntemi kullanılarak yapılmıştır [43]. Bu yöntemle, CO₂ molekülünün su ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelen H₂CO₃ molekülünün H⁺ ve HCO₃⁻ iyonlarına ayrışarak, ortamın pH'ını değiştirme süresi ölçülmektedir [41].

Hazırlanan bütün örneklerin VSM ile her bir hazırlanma basamağından sonra manyetik özellikleri ölçülmüştür. Ölçüm sonuçları (Şekil 3.3-3.28), örneklerimizin tamamının diyamanyetik özelliğe sahip olduğunu göstermektedir. Sonuçların değerlendirilmesi (Tablo 3.1) ile elde edilen manyetik alınganlık değerinin, fazla bir değişim göstermediği görülmektedir.

CA izoenzimleri üzerine manyetik alanın etkisinin belirlenmesi amacıyla, 10000 Oe şiddetindeki manyetik alana afinite kromatografisi ile saflaştırılan izoenzimler farklı zaman aralıklarında maruz bırakılmıştır.

Elde edilen sonuçlar, gerek hCA-I ve gerekse hCA-II izoenzimlerinin manyetik alandan farklı zamanlarda farklı şekillerde etkilendiğini göstermektedir(Şekil 3.29 ve 3.30). Bu durum, CA enziminin üç boyutlu yapısının kompleksliğiyle açıklanabilir. Ancak hCA-II izoenziminin özellikle dördüncü saate kadar aktivitesinde belirgin bir

artış olmasına rağmen daha sonraki saatlerde aktivitede belirgin oranda azalmanın olması dikkat çekmektedir.

Literatürde Farell ve arkadaşları tarafından ornitin dekarboksilaz aktivitesi üzerine manyetik alanın etkisi incelenmiştir ve çalışmamızla benzer şekilde aktivitede belirli zamanlarda azalmalar gözlenmiştir [68].

Ancak Büyüksü ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise manyetik alan altında ölçülen süperoksit dismutaz enziminin aktivitesinde önemli bir artış olduğu tespit edilmiştir [69].

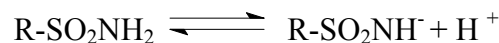
Ayrıca Kula ve arkadaşları glutamil transpeptidaz ve malat dehidrogenaz aktiviteleri üzerine manyetik alanın etkilerini incelemiştir. Enzimlerin aktivitelerinin manyetik alandan farklı şekilde etkilendikleri saptanmıştır. Bu gözlemler enzimlerin üç boyutlu yapılarının farklı olması ile açıklanabilir [70].

Araştırmamızda ayrıca manyetik alan şiddeti değiştirilerek söz konusu izoenzimler üzerine etkisi gözlemlenmiştir. Düşük manyetik alan şiddetlerin hCA-I izoenziminin aktivitesinde belirli bir azalmanın gözlemlenmesine rağmen daha yüksek manyetik alan şiddetlerinde ise aynı azalma tespit edilememiştir (Şekil 3.31)

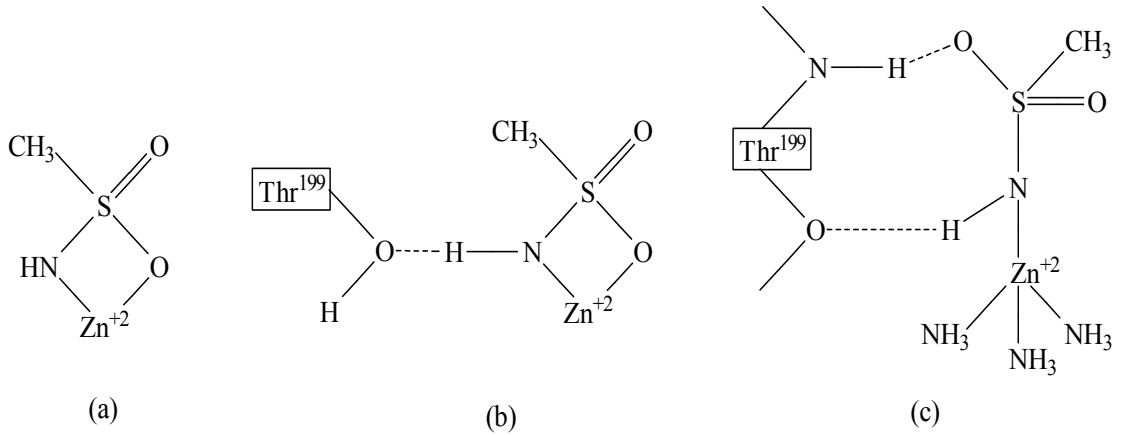
Manyetik alan altında izoenzimlerin aktiviteleri farklı pH'larda ölçüldüğü zaman (pH 7, pH8) aktivitede önemli bir değişiklik olmadığı saptanmıştır (Şekil 3.33)

Araştırmamızda CA izoenzimlerinin spesifik inhibitörleri olan sülfonamidler ve anyonların inhibisyonu üzerine manyetik alanın etkisi araştırılmıştır. Bu şekilde enzim inhibitör kompleksinin manyetik alandan nasıl etkilendiği ortaya çıkarılmıştır.

Karbonik anhidraz enzimleri R-SO₂NH₂ kimyasal yapısına sahip sülfonamidlerle inhibe edilirler. Sülfonamidlerin en çarpıcı özelliklerinden birisi:



denklemine göre kolaylıkla iyonik yapı kazanmaktadırlar. Bu özelliği, CA enzimi üzerine inhibisyon etkisi için son derece önemlidir. Sülfonamidlerin bu hidrofilik bölgesine ilaveten, aromatik ve heteroaromatik hidrofobik bölgelere sahiptir. Sülfonamidlerin enzimle etkileşmesi, öncelikle R-SO₂NH⁻ bileşiğindeki N atomunun CA enziminin aktif bölgesinde bulunan Zn⁺² ile iyonik bağlanması ile olurken, ikinci olarak da hidrofobik etkileşmelerle inhibitörün enzime bağlanması ile bu etkileşme tamamlanmış olur. Sülfonamidlerin karbonik anhidraz enzimine güçlü bir şekilde bağlanması bu iki etkinin toplamının bir sonucudur. Sülfonamidlerin karbonik anhidraz enzimine güçlü bir şekilde bağlanması bu iki etkinin toplamının bir sonucudur. Ancak bu sonucun yanında, substitüe ya da alkil sülfonamidlerin enzime bağlanmasında sadece hidrofobik etkileşmeler olduğu için, aromatik ve heterosiklik yan grup taşıyan sülfonamidlere göre daha zayıf inhibitör olma özelliği gösterirler. İnorganik anyonlarda yalnızca hidrofilik bağlanma mevcuttur. Bu nedenle CA enzimi üzerinde, sülfonamidler kadar güçlü bir inhibisyon kuramazlar [38, 39].



Şekil 4.1 Sülfonamidlerin karbonik anhidraz enzimine bağlanması [38].

Sülfonamid ve perklorat anyonu manyetik alan altında CA enzimini belirli ölçüde inhibe etmiştir. Özellikle perklorat anyonunun manyetik alan altında kontrole göre hCA-I ve hCA-II izoenzimlerine karşı ilgisinin belirli derecede arttığı saptanmıştır. Proteinkinaz C üzerine bazı bileşiklerin etkileri belirli şiddette manyetik alan altında ölçülmüş ve farklı değerler saptanmıştır [71].

Harada ve arkadaşları manyetik alanın RNA polimeraz ve DNA polimeraz enzimleri üzerinde etkileri araştırmıştır. Uygulanan manyetik alan şiddetinde söz konusu izoenzimlerin aktivitelerinin etkilenmediği saptanmıştır [72].

5.KAYNAKLAR

- [1] Supuran, C.T., and Scozzafava, A., "Carbonic Anhydrase Inhibitors", *Curr.Med.Chem.*, **1**, (2001) 61.
- [2] Maren , T.H., "Carbonic anhydrase; chemistry, physiology and inhibition", *Phsiol.Rev.*, **47**, (1967) 595
- [3] Hewett-Emmett, D., Tashian, R.E., "Functional diversity, conversation, and convergence in the evolution of the α -, β -,and γ -carbonic anhydrase gene familie". *Mol Phylogenet Evol*, **5**, (1996) 50-77.
- [4] Lindskog, S., "Structure and mechanism of Carbonic anhydrase", *Pharmacol. Ther.*, **74**, (1997) 1-20.
- [5] Smith, K.S., Ferry, J.G., "Prokaryotic carbonic anhydrases" *FEMS Microbiological Reviews* **24**, (2000) 335-366.
- [6] Tripp, B.C., Smith, K., Ferry J.G., "Carbonic Anhydrase:New Insights for an Ancient Enzyme", *The Journal of Biological Chemistry* **276**, (2001) 52 48615–48618.
- [7] So, A.K.C., Espie, G.S., Williams, E.B., Shively, J.M., Heinhorst, S., Cannon, G.C., "A novel evolutionary lineage of carbonic anhydrase (e Class) is a component of the carboxysome shell", *J Bacteriol*, **186**, (2004) 623–630.
- [8] Sly, W.S., Hu, P.Y., "Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies" *Annu Rev Biochem*, **64**, (1995) 375-401.
- [9] Parkkila, S., Parkkila, A.K., Juvonen, T., Waheed, A., Sly, W.S., Saarnio, J., Kaunisto, K., Kellokumpu, S., Rajaniemi, H., "Membrane-bound carbonic anhydrase IV is expressed in the luminal plasma membrane of the human gallbladder epithelium" *Hepatology*, **24**, (1996): 1104-1108.
- [10] Hewett-Emmett, D., Chegwidde, W.R., Carter, N.D., Edwards, Y.H., "Evolution and distribution of the carbonic anhydrase gene families. In: The Carbonic Anhydrases" New Horizons, *Birkhäuser Verlag, Basel*, (2000) 29-76
- [11] Lehtonen, J., Shen, B., Vihinen, M., Casin,i A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Parkkila, A.K., Saarnio, J., Kivelä, A.J., Waheed, A., Sly, W.S., Parkkila, S., "Characterization of CA XIII, a novel member of the carbonic anhydrase isozyme family" *J. Biol. Chem.*, **279** (2004) 2719-2727.
- [12] Hilvo, M., Tolvanen, M., Clark, A., Shen, B., Shah, G.N., Waheed, A., Hamli, 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”, *Biochem J.*, **392**, (2005) 83-92.

[13] Karhumaa, P., Parkkila, S., Waheed, A., Parkkila, A.K., Kaunisto, K., Tucker, P.W., Huang, C.J., Sly, W.S., Rajaniemi, H., “(Nuclear NonO/p54(nrb) protein is a nonclassical carbonic anhydrase”, *J Biol Chem*, **275**, (2000) 16044-16049.

[14] Chegwidde, W.R., Dodgson, S.J., Spencer, I.M., “In the carbonic Anhydrase New Horizons”, *Birkhauser Verlag, Basel*, (2000), 343-363.

[15] Keha, E.E., “Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için geliştirilmiş bir afinite kromatografisi metodu”, Doçentlik Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Erzurum, (1981)

[16] Wistrand, P.J., “The importance of Carbonic Anhydrase B and C for the unloading of CO₂ by the human erythrocyte”, *Acta Physiol. Scand.*, (1981), 343.

[17] Lo, Y.S, Nolan, J.C, Maren,T.H, Welstead, W.J, Gripshover, D.F and Shamblee, D.A. “Synthesis and physicochemical properties of sulfamate derivatives as topical antiglaucoma agents.” *J. Med.Chem.*, **35**, (1992),4790.

[18] Kaiser, E.T., and Lo, K.W., “The Carbonic anhydrase catalysed hydrolysis of 2-hydroxy-5-nitrotoluen sulfonic sultane”, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, (1969), 4912.

[19] Jabusch, J.R., Deutsch, H.F., “Localization of the lysines acetylated in ubiquitin reacted with p-nitrophenyl acetat”, *Arch. Biochem. Biophys.*, (1989) 238, 170.

[20] Schcer, A., Dietsch, P., “A 54.000 molecular weight protein with carbonic anhydrase activity in rabbit erythrocytes in Biology and Chemistry of the Carbonic anhydrase”, *Annals New York Acad. Sci.*, (1984) **429**, 241.

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

[22] Tashian, R.E., Hewett-Emmett, D., and Goodman, M., “On the evolution and genetics of carbonic anhydrase I, II and III isozymes: Current topics in Biological and Medical Research”, *Molecular Structure and Regulation*, **7**, (1983), 79.

[23] Deutsch, H.F., “Carbonic anhydrase”, *Int. J. Biochem.*, **19**, (1987) 100.

[24] Wistrand, P.J., “Solubilization and preliminary characterization of membrane bound Carbonic anhydrase”, *J. Med. Sci.*, **85**,(1980) 75.

[25] 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**, (1982) 914.

[26] Lin, K.T.D., Deutsch, H.F., “Human Carbonic anhydrase XII, the complete structure of the C isoenzyme”, *J. Biol. Chem.*, **249**, (1974) 2329.

- [27] Carter, N., Jeffrey, S., Shiels, A., Edward, Y., Tiplen, T., Hopkins, D.A., "Characterization of human Carbonic anhydrase III from skeletal muscle", *Biochem. Genetics*, **17**, (1979) 837.
- [28] <http://talks.php.net/presentations/slides/mdb/images/> (01.08.2006)
- [29] Stams, T., Chen, Y., Bariack-Sjodin, P.A., Hurt, J.D., Liao, J., May, J.A., Dean, T., Laipis, P., Christianson, D.W., *Protein Sci.*, **7**, (1998) 556.
- [30] Supuran, C.T., Scozzafava, A. "Carbonic anhydrase inhibitors-Part 94.1,3,4-Thiadiazole-2-sulfonamide derivatives as antitumor agents?" *European Journal of Medicinal Chemistry*, (2000) **35** (9), 867.
- [31] Maren, T.H., "Carbonic anhydrase: General perspectives and advances in glaucuma research", *Drug dev. Res.*, **10**, (1987) 255.
- [32] Arslan, O., "Inhibition of Bovine Carbonic Anhydrase by New Sulfonamide Compounds", *Turk J. Med. Sci.*, **66** (9) (2001), 982
- [33] Winum, J.,Y., Scozzafava, A., Montero, J.L., Supuran, C.,T. "Sulfamates and Their Therapeutic Potential", *Medicinal Research Reviews*, 2004 Wiley Periodicals, Inc.
- [34] Franchi, M., Vullo, D., Lallori, E., Pastorek, J., Russo, A., Scozzafava, A., Pastorekova, S., Supuran, C.T. "Carbonic Anhydrase Inhibitors, Inhibition of Cytosolic Isozymes I and II and Transmembrane Cancer-associated Isozyme IX with Lipophilic Sulfonamides", *J Enzyme Inhib. And Med. Chem.*, **184**, (2003) 333.
- [35] Hewett-Emmett, D., "In the Carbonic Anhydrase New Horizons", Birkhauser Verlag, Basel, (2000), 29.
- [36] Winum, J., Y., Innocenti, A., Nasr, Montero, J., L., Scozzafava, A., Vulloa, D., and 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** (2005), , 2353.
- [37] 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**, (2005), 1683.
- [38] Arslan, O. , "Glaucuma Tedavisinde Kullanılmaya Aday Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Sentezi ve İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması", *Doktora Tezi*, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, (1994)
- [39] Keha, E. E., Küfrevioğlu, Ö. İ., "Biyokimya", *Derya Kitabevi*, Trabzon, **34** (1993),.

- [40] Hazen, S. A., Waheed, A., Sly, W. S., La Nove, K. F., and Lynch, C. J., “Differentiation-Dependent Expression of CA and the Role of Carbonic Anhydrase Isozymes in Pyruvate Carboxylation in Adipocytes”, *FASEB J.*, **10**, (1996), 481.
- [41] Lakkis, M.M . , Bergenhem, N .C .N . ,and Tashian ,R .E . , “Expression of Carbonic Anhydrase of Mouse VII in E.Coli and Demonstration of its CO₂ Hydratase Activity” , *Biochem .Biophys .Res . Commun .* , **226**, (1996) , 268 .
- [42] Mastrolorenzo A . ,Zuccati , G . , Massi ,D . , Gabrielli, M . G . , Casini , A . , Scossafava , A . , Supuran C. T . , *European*
- [43] Bayram, T., “Köpek Eritrositlerinden Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılan Karbonik Anhidraz Enziminin Sülfonamidlerle İnhibisyon Kinetiğinin İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2005).
- [44] Sugrue, M.. F., “The Preclinical Pharmacology of Dorzolamide hydrochloride, a Topical Carbonic Anhydrase Inhibitor”, *J. Ocular Pharmacol. Ther.*, **12**, (1996), 363.
- [45] Holmes, R., S., “Purification, Molecular Properties and Ontogeny of Carbonic Anhydrase Isozymes Evidance for A, B and C İzozymes in Avian and Mammalian Tissues”, *Eur. J. Biochem.*, **78** (1977), , 511.
- [46] Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, and H., Kührevioğlu, İ. Ö., “A New Method for the Purification of Carbonic Anhydrase Isozymes by Affinity Chromatography”, *Turk J. Med Sci.*, **26**, (1995), 163.
- [47] Geers, C., and Gros., G., “Carbon Dioxide Transport and Carbonic Anhydrase in Blood and Muscle”, *Physiological Reviews*, **80** (2000), , 681.
- [48] Maren , T. H . , Conroy C.W. , Wynns,G. C . ,and Godman ,D. R. ,”Renal and Cerebrospinal Fluid Formation Pharnalogy of a High Molecular Weight Carbonic Anhydrase Inhibitor “ , *J. Of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **280**,(1997), 98.
- [49] 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*,(2004),**577**,439.
- [50] Türeci, Ö., Şahin, 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. Natl Acad. Sci. USA*, (1998), **95**, 7608.
- [51] 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 e. ective Inhibitor of the Cytosolic Isozyme II and Mitochondrial

Isozyme V Solution and X-Ray Crystallographic Studies”, *Elsevier Science*, (2005) **15**, 2315.

[52] Cuatrecasas, P., “Protein Purification by Affinity Chromatography, Derivatizations of Agarose and Polyacrylamide Beads ”, *J. Biol. Chem.*, **245**, (1970), 3059.

[53] Khn, J., Wilchek, M., “A Colorimetric Method for Monitoring Activation of Sepharose by Cyanogen Bromide”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1978) **7**,14.

[54] Axen, R., Ernback, S., “Chemical Fixation of Enzymes Halide Activated Polysaccharide Carriers”, *Eur. J. Biochem.* (1971), **18**,351.

[55] Blatter-Garin, M.C., Kalix, B., De Pre, S. and James, R.W., “Aspirin use is associated with higher serum concentrations of the antioxidant enzyme, paraoxonase-1”, *Diabetologia*, (2003) **46**, 593.

[56] <http://www.amersham.com/businesses/Biosciences.html>

[57] Özensoy, Ö., “Eritrositlerden Karbonik Anhidraz İzoenzimlerinin Saflaştırılması İçin Yeni Bir Afinitive Jelinin Sentezi ve Uygulanması ” *Yüksek Lisans Tezi*, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı

[58] Primo-Parmo, S.L., Sorenson, R.S., Teiber, J. and La Du, B.N., “The human serum paraoxonase/arylesterase gen (PON1) is one member of a multigene family”, *Genomics*, (1996) **33**, 498.

[59] Wilbur, K. M., and Anderson, N. G., “Electrometric and Colorimetric Determination of Carbonic Anhydrase”, *J. Biol. Chem.*, **176**, (1948), 147

[60] Sinan, S., “İnsan Serum Paraoksonaz Enziminin Yeni Bir Yöntemle Saflaştırılması Ve Bazı Antibiyotiklerin Enzim Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması” *Doktora Tezi*, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı

[61] Yu, BP, “Cellular defences against damage from reactive oxygen species”, *Physiological Rev.* (1994) **74**, 139.

[62] Atkinson D., “Physical Principles of Magnetic Materials, Short Course Notes”, “Wolfson Centre For Magnetics Technology, Cardiff School of Engineering University of Wales, Cardiff, (1996)

[63] Serway Raymond A., *Physics for Scientists & Engineers with Modern Physics Çevir. Ed.Çolakoğlu K., Palme Yayıncılık*, **852**, (1996)

[64] Koçkar H., “Magnetic Material Production Using A Novel Rotating Cryostat and Their Magnetic And Structural Analysis ”University of Wales Cardiff, 65-69, 88-93, (1998)

[65] V.S.M Operating Manuals, Moltspin Ltd., 1993

[66] Topçu H. “NiFe İnce Filmlerin Elektrodpozisyonu ve Karakterizasyonu” Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fizik Anabilim Dalı, (2003)

[67] Kitchen, B.J., Masters, C.J. and Winzor, D.J., “Effects of lipid removal on the molecular size and kinetic properties of bovine plasma arylesterase”, *Biochem J*, (1973) **135**, 93.

[68] Farell, J. M., Barber, M., Krause, D., Litovitz, T.A., “Effects of low frequency electromagnetic fields on the activity of ornithine decarboxylase in developing chicken embryos”, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **43**, (1997). 91-96.

[69] Büyüksulu, N., Çelik, Ö., Atak, Ç., “ The effect of mgnetic field on the activity of superoxide dismutase”, *Journal of cell and molecular biology*, 5: **57** (2006) 57-62.

[70] Kula, B., Sobczak, A., Grabowska-Bochenek, R., Piskorska, D., “Effect of electromagnetic field on serum biochemical parameters in the stil workers”, *Journal of Occup Health*, **41**: (1999) 177-180.

[71] Richard, D., Lange, S., Vi,ergutz, T., Kriehuber, R., Weiss, D.G., Simko, M., “Influence of 50 Hz electromagnetic fields in combination with a tumor promoting phorbol ester on protein kinase C and cell in human cells”, *Molecular and cell biochemistry* **232**: (2002) 133-141.

[72] Harada, S., Yamada, S., Kuramata, O., Gunji, Y., Kawasaki, M., Miyakawa, T., Yonekura, H., Sakurai, S., Bessho, K., Hosono, R., Yamamoto, H., “Effects of high ELF magnetic fields on enzyme-catalyzed DNA and RNA sythesis in vitro and on a cell-free DNA mismatch repair”, *Bioelectromagnetics*, **22**, (2001) 260-266.

[73] <http://cnsm.kaist.ac.kr/vsm.html> (12.06.2006)

[74] Karaağaç Ö, CoCu Alaşım Elektrodpozisyonu,Yapısal ve Manyetik Özellikleri Üzerine Depozisyon Parametrelerin Etkisinin İncelenmesi, Yüksek lisans tezi, Balıkesir Üniversitesi, Balıkesir, (2007)