



**SIĞIR BÖBREK KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI DOĞAL
MOLEKÜLLERLE İNHİBİSYONUNUN BELİRLENMESİ**

Habip ÇELİK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK
2017**

Her hakkı saklıdır

AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SIĞIR BÖBREK KARBONİK ANHİDRAZ
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU
VE BAZI DOĞAL MOLEKÜLLERLE
İNHİBİSYONUNUN BELİRLENMESİ

Habip ÇELİK

KİMYA ANABİLİM DALI

AĞRI

2017

Her hakkı saklıdır



T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ ONAY FORMU

SİĞİR BÖBREK KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI DOĞAL MOLEKÜLLERLE İNHİBİSYONUNUN BELİRLENMESİ

Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK danışmanlığında, Habip ÇELİK tarafından hazırlanan bu çalışma, 04/12/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Doç.Dr.Murat ŞENTÜRK

İmza :

Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr.İmdat AYGÜL:

İmza :

Jüri Üyesi: Yrd.Doç.Dr.Aykut ÖZTEKİN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu .../.../201.. tarih ve / nolu kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. İbrahim HAN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma TUBİTAK Kimya Biyoloji Araştırma Destek Grubu birirmince desteklenmektedir.
Proje No: 114Z731.

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

SIĞIR BÖBREK KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BAZI DOĞAL MOLEKÜLLERLE İNHİBİSYONUNUN BELİRLLENMESİ

Habip ÇELİK

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK

Karbonik anhidraz (CA) (E.C. 4.2.1.1) enzimi, hemen hemen tüm canlılarda CO_2 'in hidratlanarak HCO_3^- ve H^+ 'ya dönüşümünü tersinir olarak katalizleyen çok önemli bir enzimdir. Bu çalışmada, sığır böbrek karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için yeni sentezlenen benzilselüloz-sülfanilamid afinite jeli kullanıldı.

Çalışmanın ikinci kısmında bazı doğal maddelerin (kuarsetin, katekin, klorojenik asit, absisik asit, morin ve rutin) saflaştırılan ve karakterizasyonu yapılan bu CA enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri incelendi. Bu amaçla enzim aktiviteleri üzerine inhibisyon etkisi gösteren bu doğal hidroksilli maddeler için IC_{50} değerleri hesaplandı.

2017, 53 sayfa

Anahtar Kelimeler: Karbonik andidraz, böbrek, afinite jeli, hidroksilli madde

ABSTRACT

PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND DETERMINATION OF INHIBITION WITH SOME NATURAL MOLECULARS OF BOVINE RENAL CARBONIC ANHYDRASE ENZYME

Habip ÇELİK

Ağrı Ibrahim Cecen University
Science Institute
Chemistry Department

Administrator: Assoc. Prof. Dr. Murat ŞENTÜRK

The carbonic anhydrase (CA) (E.C. 4.2.1.1) enzyme is a very important enzyme that reversibly catalyzes the conversion of HCO_3^- and H^+ to hydration of CO_2 in almost all living organisms. In this study, a newly synthesized benzylcellulose-sulfanilamide affinity gel was used for the purification of the bovine kidney carbonic anhydrase enzyme.

In the second part of the study, the inhibitory effects of some natural substances (quercetin, catechin, chlorogenic acid, abscisic acid, morin and rutin) on the purified and characterized CA enzyme were investigated. For this purpose, IC_{50} values were calculated for these natural hydroxylic substances which have an inhibitory effect on enzyme activities.

2017, 53 pages

Key words: Carbonic anhydrase, kidney, affinity gel, hydroxylated compound

TEŞEKKÜR

Yükseklisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın deneysel kısmı Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Merkezi Araştırma ve uygulama Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Öncelikle çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübesi ile bana rehber olan, sabrını, maddi ve manevi desteğini benden hiç esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Murat ŞENTÜRK'e sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında arkadaşlığını ve yardımlarını esirgemeyen değerli dostum Sayın Mustafa ORHAN'a ayrıca teşekkür ederim.

Çalışmamın her aşamasında maddi manevi yardım ve desteklerinin yanı sıra göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı Annem'e, Babam'a, çok değerli Abim Halim ÇELİK'e ve bütün aileme sonsuz teşekkürlerimi ve şükran duygularımı sunarım.

Habip ÇELİK

Aralık 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	II
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR.....	III
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Karbonik Anhidraz Enzimi	4
1.2. Karbonik Anhidrazların Katalitik ve İnhibisyon Mekanizması	6
2. KAYNAK ÖZETLERİ	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1. Materyal.....	21
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	21
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar	21
3.1.3. Afinite kolonunda ve PAGE’de kullanılan çözeltiler ve hazırlanmaları	21
3.2. Yöntem	24
3.2.1. Protein tayini	24
3.2.1.a. Kalitatif protein tayini	24
3.2.1.b. Bradford yöntemi ile protein tayini	24
3.2.2. Karbonik anhidraz aktivitesi tayini	24
3.2.3. Afinite kromatografisi jelinin hazırlanması	26
3.2.3.a. Afinite kolonunun paketlenmesi	26
3.2.4. Sığır böbrek karbonikanhidraz’ın izolasyonu	27
3.2.6. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim saflığının kontrolü.....	27
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	28
4.1. Kantitatif Protein Tayini için Kullanılan Standart Grafik	28
4.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Enzim Saflığının Kontrolü	29

4.3. Sığır Böbreğinden Saflaştırılan karbonik anhidraz Enzimi için Kinetik Çalışmalar	30
4.3.1. Sığır böbrek dokusundan saflaştırılan Karbonik anhidraz izoenzimi için optimum iyonik şiddet çalışması.....	30
4.3. Sığır böbreğinden saflaştırılan karbonik anhidraz enzimi için optimum pH çalışması	31
4.3.2.a. Tris-SO ₄ için optimum pH çalışması.....	31
4.3.2.b. KH ₂ PO ₄ tamponu için optimum pH çalışması	33
4.3.3. Stabil pH çalışması.....	34
4.3.4. Sığır böbreğinden saflaştırılan karbonik anhidraz enzimi üzerine Flavonoitlerin etkilerinin esteraz metodu ile bulunması	35
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	39
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	52

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CA	: Karbonik anhidraz enzimi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
E	: Enzim
E.C.	: Enzim kod numarası
E.Ü.	: Enzim Ünitesi
EI	: Enzim-İnhibitör kompleksi
ES	: Enzim-substrat kompleksi
ESI	: Enzim-substrat-inhibitör kompleksi
I	: İnhibitör
I ₅₀	: Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
K _i	: Enzim inhibitör kompleksinin ayrışma sabiti
K _m	: Enzimin substrata ilgisini gösteren sabit
M _A	: Molekül kütlesi
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
S	: Substrat
SCA-II	: Koyun karbonik anhidraz II izoenzimi
SCA-IV	: Koyun karbonik anhidraz IV izoenzimi
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametietilendiamin
Tris	: Trihidroksimetil amino metan
V	: Hacim
V _{max}	: Maksimum hız
λ	: Dalga boyu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Karbonik anhidraz enziminin CO ₂ -hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik olarak gösterilişi.....	7
Şekil 1.2. CA ların eritrositlerdeki rolü	13
Şekil 4.1. Bradford metoduyla proteinlerin kantitatif tayinin için kullanılan standart grafik.....	28
Şekil 4.2. SDS- PAGE fotoğrafı 1 ve 2 nolu kuyu (sığır böbreğinden karbonik anhidraz) 3 Standart proteinler (66 kda, 45 kda, 29 kda).	30
Şekil 4.3. Tris-SO ₄ tampon çözeltileri kullanılarak Sığır böbreği CA enziminin optimum iyonik şiddeti için değişim grafiği.....	31
Şekil 4.4. 20 mM Tris-SO ₄ Tampon çözeltileri kullanılarak sığır böbreği CA enzimi için yapılan optimum pH-aktivite grafiği	32
Şekil 4.5. 20 mM KH ₂ PO ₄ tampon çözeltileri kullanılarak sığır böbreği CA enzimi için yapılan optimum pH-aktivite grafiği.....	33
Şekil 4.6. Değişik pH'lardaki 20 mM Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak sığır böbreği CA enzimi için elde edilen stabil pH grafiği.....	34
Şekil 4.7. Quarsetin'nin sığır böbreği CA enzimi aktivitesi üzerine etkisinin %Aktivite-[quarsetin] grafiği.....	36
Şekil 4.8. Katekin'nin sığır böbreği CA enzimi aktivitesi üzerine etkisinin %Aktivite-[Katekin] grafiği.....	36
Şekil 4.9. Klorogenik asit'in sığır böbreği CA enzimi aktivitesi üzerine etkisinin %Aktivite-[Klorogenik asit] grafiği.....	37
Şekil 4.10. Abssisik asit'in sığır böbreği CA enzimi aktivitesi üzerine etkisinin %Aktivite-[Abssisik asit] grafiği.	37
Şekil 4.11. Morin'in sığır böbreği CA enzimi aktivitesi üzerine etkisinin %Aktivite-[Morin] grafiği.	38
Şekil 4.12. Rutin'in sığır böbreği CA enzimi aktivitesi üzerine etkisinin %Aktivite-[Rutin] grafiği.	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. CA izoenzimlerinin katalitik aktiviteleri, sülfanamidlere ilgileri ve hücre içinde bulunma yerleri.	8
Çizelge1.2. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyonlar	9
Çizelge 4.1. Sığır böbreğinden CA enziminin sülfanilamid afinite kolon materyali ile saflaştırılma sonuçları	29
Çizelge 4.2. Sığır böbreği CA enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları	31
Çizelge 4.3. 20 mM Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak sığır böbreği CA enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	32
Çizelge 4.4. 20 mM KH ₂ PO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak sığır böbreği CA enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	33
Çizelge 4.5. Sığır böbreği CA enziminin stabil pH'sı için 20 mM Tris-SO ₄ tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları.....	34
Çizelge 4.6. Sığır böbrek CA izoenzimi üzerine hidrataz aktivitesi yöntemi ile bazı Flavonoitlerin etkileri ve IC ₅₀ değerleri.....	35

1. GİRİŞ

Laboratuvarlar birçok önemli kimyasal reaksiyonların kimyagerler tarafından gerçekleştirildiği ve buradan çıkan sonuçların insanlığa sunulduğu önemli merkezlerdir. Bunun gibi her canlı vücudunda da milyonlarca laboratuvarın varlığı dikkatlerden kaçmamalıdır. Hücre ve hücrelerden oluşmuş canlılar durup dinlenmeden reaksiyonlar gerçekleştiren kimyasal laboratuvarlardır. Bu laboratuvarlarda iş gören kimyagerler ise enzim olarak adlandırılan biyo-makromoleküllerdir. Biyokimya tarihinde en fazla yer kaplayan çalışmalar enzimler üzerinde gerçekleştirilmiştir (Lehninger 2005).

Enzimler, canlı hücreler tarafından sentezlenen ve canlı metabolizmasındaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşturmada %100 ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Katalitik RNA moleküllerinin (ribozimler) küçük bir grubu hariç olmak üzere, bütün enzimler protein yapısındadır. Proteinlerin en büyük ve özelleşmiş grubunu teşkil ederler (Keha ve Küfrevioğlu 2007).

Enzimlerin katalitik aktiviteleri, doğal protein konformasyonunun sağlamlığına bağlıdır. Eğer enzim denatüre olursa veya alt birimlerine ayrılırsa katalitik aktivitesi genellikle yok olur (Lehninger 2005).

Enzimler diğer proteinler gibi yaklaşık 12 000'den 1 milyona kadar değişen molekül kütlesine sahiptir. Bazı enzimler aminoasit kalıntıları dışında aktivite için kimyasal gruplara gereksinim duymaz. Diğerleri **kofaktör** olarak adlandırılan Fe^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} veya Zn^{+2} gibi bir veya daha fazla inorganik iyon veya **koenzim** olarak adlandırılan kompleks organik ve metalloorganik moleküllere gereksinir. Bazı enzimler aktivite için hem koenzime hem de bir ya da birden fazla metal iyonuna gereksinir. Enzim proteinine çok sıkı olarak veya hatta kovalent olarak bağlanan bir koenzim veya metal iyonu bir **prostetik grup** olarak adlandırılır. Metal iyonlarıyla ve/veya koenzimleriyle birlikte katalitik olarak aktif olan bir enzim **holoenzim** olarak adlandırılır. Bu gibi enzimlerin protein kısmı **apoenzim** veya **apoprotein** olarak adlandırılır (Lehninger 2005).

Birçok enzim aktivitesini tarif eden deyim veya kelimeye ya da substratın adına “-az” son eki ilavesiyle adlandırılır. Böylece üreaz; ürenin hidrolizini, DNA polimeraz; DNA oluşturmak üzere nükleotidlerin polimerleşmesini katalizler. Pepsin ve tripsin gibi diğer enzimler substratlarını veya tepkimelerini belirtmeksizin isimlendirilir. Zamanla, birçok enzimin daha ortaya çıkarılması sonucu, sistematik bir isimlendirilmeye ihtiyaç duyuldu. Bunun üzerine enzimler, uluslararası enzim komisyonu tarafından katalizledikleri reaksiyon tipleri ve reaksiyon mekanizmalarına göre bir sınıflandırılmaya tabi tutuldu. Örneğin E.C.2.7.1.1. kod numarasında 2, bu enzimin bir transferaz enzimi olduğunu; 7 bir fosfat grubu transfer edildiğini; 1 fosfat transferinin alkol grubuna olduğunu ve son 1 rakamı da bu enzimin alkol grubuna fosfat transferini sağlayan enzimler arasında ilk sırayı aldığını göstermektedir.

Enzimler 6 gruba ayrılmışlardır;

1.Oksiredüktazlar: 2 substrat arasında redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

2.Transferazlar: İki substrat arasında hidrojen dışındaki grupların transferini katalizleyen enzimlerdir.

3.Hidrolazlar: Ester, eter, peptid, glikozid, anhidrit, C-halojenür veya P-N bağlarının bir H₂O molekülünün katılmasıyla hidrolizini katalizleyen enzimlerdir.

4.Liyazlar: Hidrolizden farklı bir mekanizma ile substratlardan grupların uzaklaştırılıp, çift bağların oluşturulduğu reaksiyonları katalizleyen enzimlerdir.

5.İzomerazlar: Geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalizleyen enzimlerdir.

6.Ligazlar: ATP ve GTP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden fosfat bağının kopması sonucu ortaya çıkan enerji yardımıyla iki molekülün bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir (Lehninger 2005; Keha ve Küfrevioğlu 2007).

Enzim İnhibisyonu: Enzim inhibitörleri enzimatik tepkimeleri yavaşlatarak veya durdurarak katalizleyen moleküler ajanlardır. Enzimler hemen hemen bütün hücresel süreçleri katalizler. Böylece enzim inhibitörlerinin bilinen en önemli farmakolojik ajanlar arasında olması sürpriz olmamalıdır. Enzim inhibitörlerinin genellikle iki sınıfı vardır: geri-dönüşümlü (reversible) ve geri dönüşümsüz (irreversible) (Lehninger 2005).

Dönüşümsüz İnhibisyon: Geri-dönüşümsüz inhibitörler bir enzimle birleşen veya enzimin aktivitesi için esansiyel olan bir işlevsel grubu bozan veya özellikle kararlı kovalent olmayan bir yapı meydana getiren bileşiklerdir. Bir geri-dönüşümsüz inhibitör ve bir enzim arasındaki kovalent bağlanmanın oluşumu yaygındır. (Lehninger 2005)

Dönüşümlü İnhibisyon: Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi yarışmalı (kompetitif) olanıdır. Yarışmalı inhibitör, yapı itibarıyla substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylece substratın enzime bağlanması önlenmiş olur. Fakat substrat konsantrasyonunu artırmakla inhibisyon etkisi kaldırılabilir. Yani enzimin V_{max} değeri değişmez. Yani inhibitör komplekslerinin ayrışmaları bir denge reaksiyonu olduğundan substrat konsantrasyonun artırılması dengeyi ES kompleksi lehine kaydırır.

Yarışmasız inhibisyonunda inhibitör ve substrat enzim moleküllerine aynı anda bağlanabilir. Bu bağlanmanın enzimin aynı bölgesine olmadığını gösterir. Yarışmasız bir inhibitör etkisini bir enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek gösterir. Burada substrat ve inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonunu artırarak inhibisyon kaldırılmaz. Enzimin V_{max} değeri azalırken, K_M sabit kalır. Substrat ve inhibitör farklı bölgelere yapışabildiğinden enzimin iki çeşit inaktif kompleksi meydana gelir: EI ve ESI. ESI'dan I dönüşümlü olarak ayrışabildiğinden yine ürün meydana gelebilir, fakat katalizlemede yavaş olur.

Bir başka inhibisyon tipi yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyonudur. Bu inhibisyon çeşidinde inhibitör serbest enzime değil, sadece ES kompleksine bağlanabilir. Unkompetitif inhibitör varlığında substrat konsantrasyonunun yükseltilmesiyle inhibisyon artabileceğini göstermektedir. Buna göre inhibitör varlığında ortamdan sürekli ES kompleksi uzaklaştığı için K_M azalır. Aynı zamanda ortamda ESI kompleksi sürekli var olacağından V_{max} da düşer (Keha ve Küfrevioğlu 2007).

1.1. Karbonik Anhidraz Enzimi

Karbonik anhidraz tüm organizmalarda genel olarak bulunan ve aktif bölgesinde Zn^{+2} iyonu içeren bir metaloenzimidir (karbonat hidrolizaz E.C.4.2.1.1). Sığır eritrositlerinden ilk defa keşfedilen karbonik anhidraz (CA), canlılarda CO_2 'nin hidratasyonu ve HCO_3^- 'in dehidratasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen önemli bir enzimdir (Supuran and Scozzafava 2001).



Karbonik anhidrazlar (CA: EC 4.2.1.1) insanları içeren yüksek omurgalıları kapsayan yaygın bir metaloenzimidir (Supuran 2004). Bu metaloproteinler kofaktor olarak çinkoyu kullanarak CO_2 ve HCO_3^- arasındaki dengeyi katalizler.

Çinko bağlı enzimin on altı izoenzimi farklı inhibitörlere göre hassasiyeti ve katalitik aktivitesi, hücre içinde bulunma yerindeki farklılığa göre tanımlanmışlardır. Bu izoenzimlerin bazıları sitozolik (CA I, CA II, CA III, CA VII ve CA XIII), diğerleri membrana bağlı (CA IV, CA IX, CA XII ve CA XIV), iki tanesi mitokondriyel (CA VA ve CA VB) ve bir tanesi salgıda salgılanır (CA VI) (Hilvo *et al.* 2005). CA XV izoformu insanlarda ve diğer maymunlarda ekspresiyona uğramazken fare ve diğer yüksek omurgalılarda bol miktarda eksprese olur (Hilvo *et al.* 2005). CA bağlı proteinler olarak adlandırılan (CARPs): CARP VIII, CARP X ve CARP XI olmak üzere üç tane nonkatalitik formu bulunmaktadır (Supuran 2004; Ekinci 2006).

Şu ana kadar α , β , γ , δ ve ζ olarak adlandırılan ve değişik kaynaklardan gelen CA ların en az beş sınıfı bulunmaktadır (So *et al.* 2004; Supuran 2008; Bertucci *et al.* 2009) CA'lar alternatif metal kofaktörü olarak kadmiyumu kullanan ζ formu dışında, çinko içeren metalo enzimlerdir (Lane *et al.* 2005; Xu *et al.* 2008). Ek olarak γ - CA'lar en azından anaerobik Archaea *in vivo* ortamda demir içerirler (Tripp *et al.* 2004; Macauley *et al.* 2009). CA'lar tarafında katalizlenen reaksiyon organizmalardaki asit-baz düzenlemesinde çok önemlidir. CA'lar omurgalılarıdaki kemik erimesi, glukoneogenez, vücut sıvısının üretimi, CO_2 ve HCO_3^- ün taşınması gibi pek çok diğer fizyolojik süreçlere katılır (Sly and Hu 1995).

Bugüne kadar, CA'ların 5 farklı sınıfı belirlenmiştir: α , β , γ , δ ve ζ (Zimmerman *et al.* 2007). Önceden ϵ -CA olarak bilinen bir sınıf (So *et al.* 2004), archaeal Cab tipi ve bitki tipi β CA'larda olan kıvrıma benzer bir kıvrım gösteren kristalografik yapısına (Sawaya *et al.* 2006) dayanılarak yeni bir β CA tipi olarak yeniden sınıflandırılmıştır (Kimber and Pai 2000). ζ CA'da aktif bölgenin geometrisi β CA'lardakinin hemen hemen aynısıdır ve aynı zamanda kıvrımda bazı benzerlikler vardır ki bu kıvrım ζ CA'ların β CA'lardakinin mesafe olarak ayrılmış alt tipini temsil edebileceği önermesine yol açmıştır (Xu *et al.* 2008).

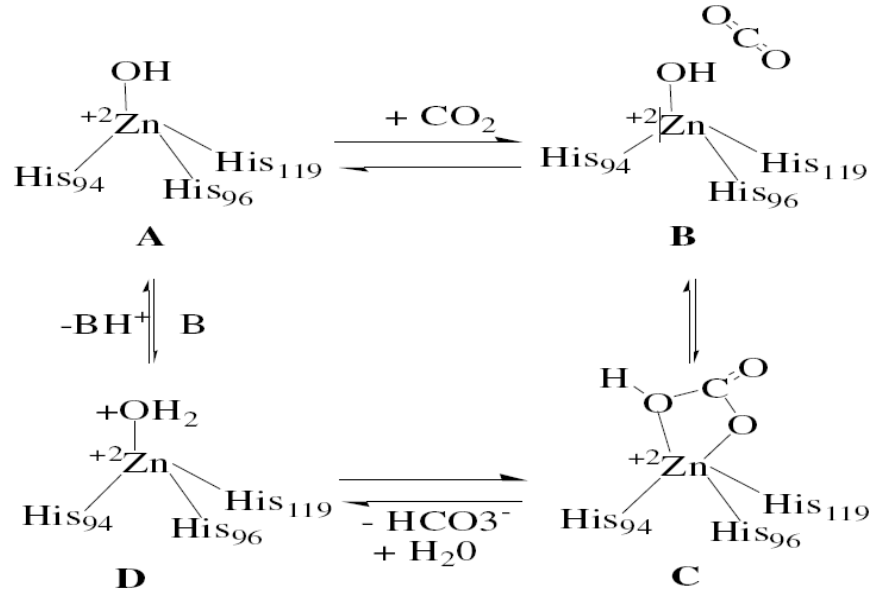
Üç ana sınıf CA (α , β , γ) lar her tarafa dağılmışken, δ CA'lar yalnızca tek hücreli deniz otlarında ve diğer deniz flanktomlarında, ζ CA'lar yalnızca tek hücreli deniz otlarında bulunur. CA γ orthologları, archaea bakteri ve bitkilerde bulunur (Parisi *et al.* 2004; Zimmerman *et al.* 2007). Fakat hayvanlarda ve mantarlarda ikinci planda kalmaktadır (Elleuche and Poggeler 2009). α sınıfı Archea'larda bulunmamaktadır. Fakat bakterilerde ve eukaryalarda yeterli derecede bulunmaktadır, mantarların sadece filamentous tipi mantarlar α CA'yı içermektedir (Elleuche and Poggeler 2009). Bitkilerde ve hayvanlarda α CA'lar birçok izoform halinde bulunmaktadır. Örneğin 16 maymunlar dışındaki memelilerde 15 α CA insanlarda dahil olmak üzere maymunlarda tanımlanmıştır (Sly and Hu 1995; Fabre *et al.* 2007). β CA'lar archae ve bakterilerin etki alanlarına ait olan pek çok türü ve eukaryalarda dahil olmak üzere muhtemelen tüm bitki ve mantar türlerini kapsayan en yaygın dağılıma sahip sınıf olarak görülür

(Hewett and Emmet 2000). β CA'lar aynı zamanda bir dizi insan patojenlerinde mantarlar/mayalar ve bakteriler olarak nitelendirilmiştir ve inhibisyon profilleri sülfanil amidler, anyonlar, karboksilatlar ve borik asitler gibi çeşitli etmenler vasıtasıyla keşfedilmiştir (Klengel *et al.* 2005; Innocenti *et al.* 2008; Işık *et al.* 2008; Innocenti *et al.* 2009; Schlicker *et al.* 2009).

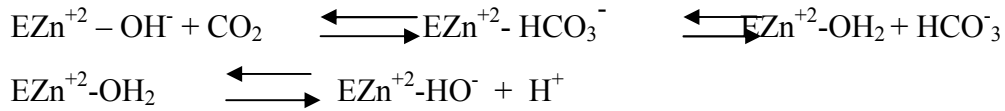
1.2. Karbonik Anhidrazların Katalitik ve İnhibisyon Mekanizması

CA'larda Zn (II) iyonu kataliz için gereklidir (Supuran and Scozzafava 2002; Supuran and Scozzafava 2000; Kim *et al.* 2000). X-ışınları kristalografik çalışmaları metal iyonunun aktif bölgenin altında 3 histidin aminoasidi ve bir su molekülü/hidroksil iyonu ile koordine edildiğini göstermektedir (His 94, His 96 ve His 119) (Briganti *et al.* 1997; Supuran and Scozzafava 2000; Kim *et al.* 2000; Supuran and Scozzafava 2002). Ayrıca çinko ile bağlı tutulan su molekülü Glu 106'nın karboksilat bölgesine bağlı Thr 99'un hidroksil grubu ile de hidrojen bağı etkileşimleri yapmaktadır. Bu etkileşimler çinkoya bağlı su molekülünün nükleofilitesini ve substratın (karbondioksit) nükleofilik saldırıya yatkınlığını arttırmaktadır (Christianson and Fierke 1996; Briganti *et al.* 1997; Supuran and Scozzafava 2000; Kim *et al.* 2000; Lindskog and Silverman 2000). Enzimin aktif bölgesinde çinko iyonuna bağlı hidroksil iyonu bulunmaktadır. Bu güçlü nükleofil hidrofobik bölgede bulunan karbondioksit molekülüne saldırır.

İnsan CA II izoenziminde Val 121, Val 143 ve Leu 198 aminoasitleri çinko iyonuna bağlı bikarbonatın oluşumunda rol almaktadırlar. Daha sonra bikarbonat iyonu bir su molekülü ile yer değiştirip ve çözeltiye geçerken, çinko iyonuna bağlı su molekülü yani katalitik olarak inaktif olan enzimin asidik formu oluşmaktadır (Briganti *et al.* 1997; Supuran and Scozzafava 2000; Kim *et al.* 2000). Enzimin tekrar katalitik olarak aktif hale (temel hali veya A formu) geçmesi için aktif bölgeden ortama proton transfer edilir, bu reaksiyon aktif bölgenin diğer rezidüleri (örneğin CA I ve CA II izoenzimlerinde His 64 amino asidi proton transferinde rol alır) veya ortamın tampon çözeltileri yardımıyla gerçekleşir. Bu işlem şematik olarak şu şekilde özetlenebilir (Christianson and Fierke 1996; Briganti *et al.* 1997).



Şekil 1.1. Karbonik anhidraz enziminin CO₂-hidratasyon reaksiyonunu kataliz mekanizmasının şematik olarak gösterilişi



CO₂ nin bikarbonata dönüşümlü hidrasyonu gibi fizyolojik reaksiyonun yanı sıra, CA'lar örneğin siyanatın karbonik asite veya siyanamidin üreye, aldehidin gem-diollere hidrasyonları: karboksilik veya sülfanamidlerin hidrolizi ve ayrıca hidrolitik prosesler gibi diğer birçok reaksiyonları katalizler (Supuran *et al.* 1997; Briganti *et al.* 1999; Guerri *et al.* 2000; Supuran and Scozzafava 2000). Ayrıca CA III'ün yapay fosfataz aktivitesi de görülmüştür (Kim *et al.* 2000). CA enzimlerinin fizyolojik öneme sahip CO₂ hidrasyonunun reaksiyonlarından başka reaksiyonları katalizleyip katalizlemediği belirsizdir. X-Ray kristal yapı belirleme çalışmaları şu an için 6 tane α (CA I-V ve CAXII izoenzimleri) (Stams and Christianson 2000) CA'ların varlığı ayrıca β ve γ CA ailelerinin varlığını da göstermiştir (Mitsuhashi 2000).

Çizelge 1.1. CA izoenzimlerinin katalitik aktiviteleri, sülfanamidlere ilgileri ve hücre içinde bulunma yerleri.

İzoenzim İçindeki	katalik aktivite (CO₂hidrasyonu)	Sülfanamidlere İlgisi	Hücre Yerleri
CA I	Düşük(CAII'nin %10'u)	Orta	Sitozol
CAII	Yüksek	Yüksek	Sitozol
CAIII	Çok düşük (CAII'nin %0,3'ü)	Çok Düşük	Sitozol
CAIV	Yüksek	Yüksek	Membrana bağlı
CAV	Ortanın Üstü	Yüksek	Mitokondri
CAVI	Orta	Ortanın Altı	Salyada bulunur
CAVII	Yüksek	Çok Yüksek	Sitozol
CARP VIII	Aktivitesi Yok	*	Sitozolik Olabilir
CAIX	Yüksek	Yüksek	Membrana bağlı
CARP X	Aktivitesi Yok	*	Bilinmiyor
CARP XI	Aktivitesi Yok	*	Bilinmiyor
CA XII	Aktif	Bilinmiyor	Membrana bağlı
CA XIII ^b	Yüksek Olabilir	Bilinmiyor	Bilinmiyor
CA XIV	Düşük	Bilinmiyor	Membrana bağlı

Çizelge 1.2. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyonlar

(1)	$O=C=O + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$
(2)	$HN=C=NH + H_2O \rightleftharpoons H_2NCONH_2$
(3)	$RCHO + H_2O \rightleftharpoons RCH(OH)_2$
(4)	$RCOOAr + H_2O \rightleftharpoons RCOOH + ArOH$
(5)	$RSO_3Ar + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + ArOH$
(6)	$ArOPO_3^{-2} + H_2O \rightleftharpoons HPO_3^{-2} + ArOH$
(7)	$ArF + H_2O \rightleftharpoons HF + ArOH$
(8)	$PhCH_2OCOC l + H_2O \rightleftharpoons PhCH_2OH + CO_2 + HCl$
(9)	$RSO_2Cl + H_2O \rightleftharpoons RSO_3H + HCl$

Karbonik anhidraz hemen hemen tüm organizmalarda bulunur (Böttcher *et al.* 1994) ve CO_2 in HCO_3^- ve H^+ ya hidrasyonunu tersinir olarak katalizler. 7 tane CA izoenzimi öncelikle memelilerden karakterize edildi (Tashian *et al.* 1991). CA izoenzimlerinin bilinen fizyolojik fonksiyonlarından biri CO_2 in ve HCO_3^- ün iç dönüşünü kolaylaştırmaktır, bu yüzden CA izoenzimleri fotosentez, kalsifikasyon, gaz dengesi, fizyolojik pH kontrolü gibi çeşitli proseslerde anahtar rol oynarlar (Jabusch and Deutsh 1985). CA'nın önemli görevlerinden biri gözde, merkezi sinir sisteminde, iç kulakta ve bazı diğer sistemlerde pH düzenlenmesi, su ve iyon transportudur (Spicer *et al.* 1982; Parkila *et al.* 1994; Mori *et al.* 1998) İnsan eritrositlerindeki CA izoenzimlerinin aktiviteleri fizyolojik şartlar altında önemli değişiklikler göstermektedir. CA aktivitesindeki değişim diabetes mellitus ve hipertansiyon gibi metabolik hastalıklar ile bağlantılı olduğu görülmüştür (Parui *et al.* 1991; Parui *et al.* 1992; Beydemir *et al.* 2002).

α -CA'ların özellikleri: Genel olarak α -gen ailesi içinde üç farklı CA izoenzim grubu bulunur. Bu grupların bir tanesi memelilerde CA I, II, III, V, VII ve XIII içeren sitoplazmik CA'ları kapsamaktadır. Bu izoenzimlerden mitokondriye bağlı CA V

dışındakiler çeşitli dokuların sitoplâzmasında bulunurlar. Bir diğer izoenzim grubu ise membrana bağlı CA'lar olarak adlandırılırlar; memelilerde CA IV, IX, XII ve XV izoenzimlerinden oluşmuşlardır. Bu izoenzimler çok farklı doku tipinde plazma membranına bağlıdır. Sonuncu grup CA bağlı proteinler olarak adlandırılan şaşırtıcı CA VIII, X ve XI izoenzimlerini içermektedirler (Tashian *et al.* 2000).

Sitoplazmik CA'lar: Memelilerde katalik olarak aktif olan 6 tane sitoplazmik CA izoenzimi (CA I, II, III, V, VII ve XIII) vardır. Bu 6 izoenzimlerden 2 tanesi yüksek turnover sayısına (CA II, VII), 3 tanesi düşük turnover sayısına (CA I, V ve XIII) ve CA III aşırı düşük turnover sayısına sahiptir (Chegwidden and Carter 2000). CA I, III ve V in düşük aktivitesinin temel sebebi proton atlama mekanizmasındaki yapısal modifikasyonlardır (Lindskog and Silverman 2000; Stams and Christianson 2000).

CA III ve V izoenzimleri için ise 64. rezidüdeki aminoasidin farklı olmasından dolayı proton transferi daha zayıf bir şekilde gerçekleşmekte ve dolayısıyla daha düşük bir katalitik aktivite gözlemlenmektedir. Ayrıca, her iki izoenzimde 65. rezidüde bir mutasyon (serin aminoasidi yerine daha dallanmış bir yan gruba sahip bir aminoasit) içermekte ve bu da proton transfer mekanizmasını inhibe etmektedir. CA III'te ise Phe-198 değişimi ile birlikte bu durum proton transfer mekanizmasının tamamen elimine olmasına yol açmakta ve bu durumda proton doğrudan sitoplâzmaya aktarılmaktadır. Oysa CA I'de 64 ve 65. rezidülerin her ikisinde de bu durumun yüksek aktiviteli CA II'deki ile eşdeğer olduğu gözlemlenmiştir. Bu durumda temel değişim (modifikasyon) aktif bölgeye 67, 200 ve 204' teki histidin aminoasitlerinin ilavesi olarak görülmekte ve böylece aktif bölge çukuru küçülmektedir. Bu durumda proton transferinin His-200 ile gerçekleştiğine inanılmaktadır.

α -CA gen ailesinde filogenetik analizi sonucu sitoplazmik izoenzimlerin en eski olduğunu açığa çıkardılar. İlginç bir şekilde bu iki izoenzim omurgalılar içinde sınırlı rollere sahip olduğunu gördüler. CA V karaciğer ve kas mitokondrilerinde sınırlıdır, CA V buralarda çeşitli biyokimyasal yollar için bikarbonat iyonu sağlarken, CA VII nin rolü henüz belirlenmemiştir (Chegwidden and Carter 2000). Fakat ilginçtir ki, CA VII nin

oldukça korunumlu yapısı ve omurgalı canlıların soyundaki varlığı bu izoenzimin önemli bir fonksiyona sahip olduğunu göstermektedir. Günümüze dek CA ile ilgili yapısal ve fonksiyonel evrimle ilgili çalışmaların çoğu daha geniş bir dağılıma sahip CA I ve II izoenzimleri üzerinde yoğunlaşmıştır (Esbaugh and Tufts 2006).

Membrana bağlı CA'lar: Memelilerde plazma membranlarına bağlı 5 tane CA izoenzimi (IV, IX, XII, XIV ve XV) bulunur (Sly 2000; Hilvo *et al.* 2005). Membrane bağlı CA'lar α -gen ailesinin çok erken gelişim evresinde sitoplazmik CA'lardan farklılaştığı görülmüştür. Bu izoenzimlerden 2 tanesi (IV ve XV) glikozilfosfatidilinositol (GPI) dayanak noktası ile membrana bağlı iken, diğer üç tanesi (IX, XII ve XIV) transmembran bölgesine sahiptirler. İlginç biçimde membrana bağlı izoenzimlerin katalizleme oranı yalnız düşük katalizleme oranına sahip CA XV in dışında genellikle yüksektir (Maren *et al.* 1993; Chegwiddden and Carter 2000; Whittington *et al.* 2004; Hilvo *et al.* 2005). Bu durum ise membran bağlı izoenzimlerle yüksek aktiviteli CA II arasında aktif bölge cebinde çok fazla sayıda aminoasit farklılığından kaynaklanmaktadır. Daha ayrıntılı bir incelemeyle, membran bağlı izoenzimlerde aktif bölge cebi ile sterik etkileşim ihtimali olmasına rağmen katalitik mekanizma ile ilgili aminoasit rezidülerinde büyük bir farklılık olmadığı açıkça görülmektedir. CA XV in düşük aktivite göstermesi ise aktif bölge cebi analizi ile açık bir şekilde ifade edilememiş, muhtemelen Asn62-Asp mutasyonu His64 ün oryantasyonunu etkilemekte ve bu da proton transfer fonksiyonunu etkisiz hale getirmektedir, fakat bu durum henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Kayda değer diğer bir nokta ise düşük aktiviteli izoenzimler CA III ve V'te bu rezidüde mutasyon göstermektedir (Esbaugh and Tufts 2006).

Çoğu sitoplazmik CA izoenzimlerinde Pro-202 rezidüsünün mutasyonu Thr-199 kavisindeki dengesizlik katalitik etkinliğin artışına öncülük edecektir. İlginçtir ki, bu mutasyonlar memeli CA IV, XIV ve XV izoenzimlerinde gerçekleşmekte, fakat bu izoenzimlerde enerji bakımından olumsuzluk veren 202. rezidüdeki mutasyona rağmen Thr-199 un ilk konformasyonu korunmaktadır. Bu genellikle Cys-23 ve 203 arasındaki disülfid köprüsünün varlığı yüzündendir. Bu köprü tüm membrana bağlı CA

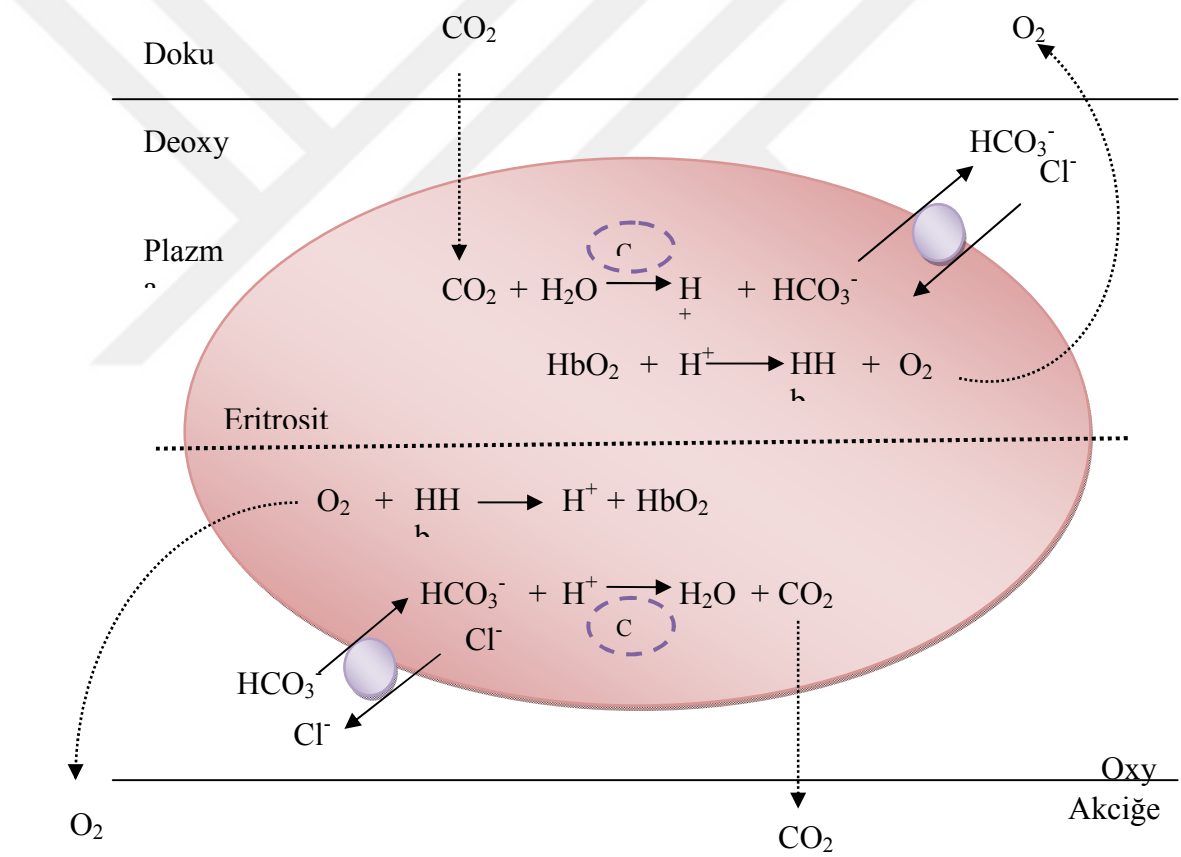
izoenzimlerini korumaktadır ve sert ekstraselüler bölge yüzeylerinde ekstra denge verdiği inanırlar (Stams and Christianson 2000). Bu köprünün aynı zamanda SDS ile CA izoenzimlerinin denatürasyonunda membrana bağı CA ların dayanıklılığını sağladığını düşünmüşlerdir (Whitney and Brigle 1982).

Daha önce bahsedildiğı gibi CA IV ve XV in ikisi de GPI ile plazma membranına bağılırlar, bu yüzden bu izoenzimler membrana bırakılmadan önce endoplazmik retikulumda posttranslasyonel modifikasyonlara uğrarlar. İlk olarak endoproteolitik enzimler N- terminal sinyal peptitdeki yarığın dışındadırlar. Bu peptide CA IV ve XV izoenzimlerinin ilk 18-20 aminoasidinden oluşmuştur ve olgunlaşmamış proteinin taşınmasında posttranslasyonel yöneltmesinde sorumludur (Waheed *et al.* 1996). C-terminal hidrofobik motif aynı zamanda GPI dayanak noktasının bağlanma bölgesine yapışmasını sağlamaktadır.Ser-266'daki bu bağlanma bölgesi tüm omurgalı CA izoenzimlerinde hemen hemen tamamen korunmaktadır (Okuyama *et al.* 1995).

CA IV ve CA XV aynı zamanda N-terminal sinyal peptidi içeren benzer transmembran izoenzimlerdir(Sly 2000). Ek olarak, bu izoenzimler C- terminal bölgesinde hidrofobik bir bölgeye sahiptir ve bu sayede transmembran bir bölge oluştururlar. Bu transmembran bölgesinin uzunluğu CA IX da 20 aminoasitten CA XII de 26 amino aside kadar değişmektedir. Aynı zamanda 25-30 aminoasitten oluşmuş küçük intraselüler bölge bulunmaktadır (Sly 2000).

CA'nın eritrositlerdeki rolü: CA enziminin en önemli rollerinden biri de ilk bulunduğı yer olan eritrositlerdeki önemidir. Eritrositlerde CA tamamen sitoplazmiktir ve temelde CO₂'in taşınması ve salınmasında rol alır. İnsan eritrosit ghost membranlarının az miktarda membran bağı CA IV enzimi içerdığı gösterilmiştir; fakat bu durumun hücreye spesifik bir ekspresyon olmadığı gösterilmiştir. CO₂ taşınması işlemi, moleküler CO₂'nin doku dışına difüze edilmesiyle başlar ve kan akışına ve oradan da eritrosit içerisine kısmi basınç gradienti yardımıyla alınmasıyla devam eder. Eritrositlerde CO₂, HCO₃⁻ ve H⁺ iyonlarına dönüştürölür. Bu işlem CA tarafından katalizlenir. HCO₃⁻ iyonu mekik yardımıyla hücre dışına gönderilir. Bu arada

H^+ hemoglobin veya non-karbonik asit tamponlarıyla, örneğin fosfat tamponları, tamponlanır. Bu işlem eritrositlerden CO_2 'nin hidrasyonu sonucu oluşan son ürünlerin her ikisinin de uzaklaştırılmasını sağlar ve kandaki CO_2 miktarını maksimize eder. Solunum organlarında (solungaç, akciğer ve/veya deri) bu reaksiyonlar tersine dönüştürülür ve CO_2 basınç gradienti yardımıyla dışarı atılır.



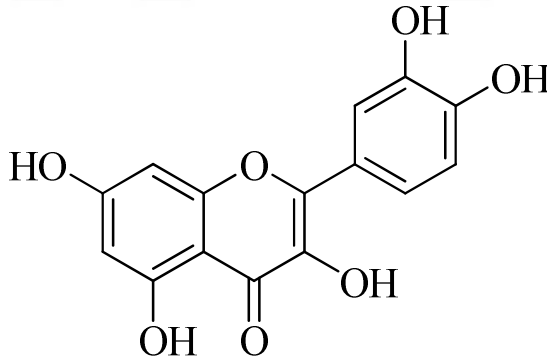
Şekil 1.2. CA'ların eritrositlerdeki rolü

Karbonik anhidraz (CA) IV fare akciğerinin mikrozomal ve plazma membranından homojenize edilerek saflaştırıldı. Yalnız bir tane N-aminoasit sekansının insan CA IV ile %55 benzerlik gösterdiği rapor edildi. 39 kda'luk fare enziminden alınan bir monospesifik antikor diğer memeli türlerinden alınan CA IV ile çapraz tepkimeler yapılarak tavşanda üretildi. Bir N bağlı oligosakkarit zinciri içeren fare akciğer CA enzimi glikozidaz ile sindirildiğinde molekül kütlesi 36 000 daltona azaldığı belirtildi. Ayrıca ek olarak oligosakkarit zinciri içeren sekiz tane memeli CA IV nün molekül

kütleleri incelendi; sonuç olarak sırasıyla akciğer mikrozomal membranına bağlı enzime peptide-N- glikozidaz ile muameleden sonra koyun, sığır ve tavşanda 52 000 den domuz, hint domuzu ve köpekten 42 000 den ve fare ve hemstır dan 39 000 den 36 000 e azaldığı belirlendi (Waheed *et al.* 1991).

Canlı organizmalar için gerekli olan çoğu ağır metal çok düşük konsantrasyonlarda hücre yapısına bağlıdır ama yüksek konsantrasyonlarda canlılarda enzim sistemlerinin inhibisyonu yoluyla toksik etkilere yol açabilir (Johnston 1976).

Kuarsetin (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one) :
Bitkilerden elde edilen flavonoida yapıda olan ve antioksidan bir madde olan kuarsetin. Bitkiler de bulunan flavonoid maddelerden bir tanesidir. Bu pigment birçok çiçek, meyve ve sebzenin rengini verir.

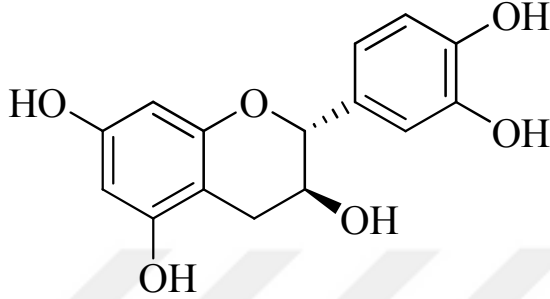


Bu maddenin en önemli özelliklerinden bir tanesikansere sebep olan kötü huylu hücrelerin büyümesini engellemesidir. Bunun dışında çeşitli sağlık sorunlarının tedavisinde ve engellenmesine de yardımcı olan anti-inflamatuar ve antioksidan özelliklere sahip bir maddedir. Kuarsetinin faydalanmak için üzüm, domates, turunçgiller, elma, çilek ve yapraklı sebzelere tüketilebilir (<http://www.buzzle.com/articles/quercetin-benefits.html>).

Katekin ((2R,3S)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)chroman-3,5,7-triol):

Katekin birçok diyet ürünü, bitki, meyve (elma, yaban mersini, üzüm çekirdeği, kivi, çilek ve benzeri gibi), yeşil çay, çikolata, kakao v.b. içinde bulunur. Çeşitli *in vitro*, *in vivo* ve fiziksel yöntemlerle bu maddenin antioksidan etkileri belirlenmiştir. Katekin

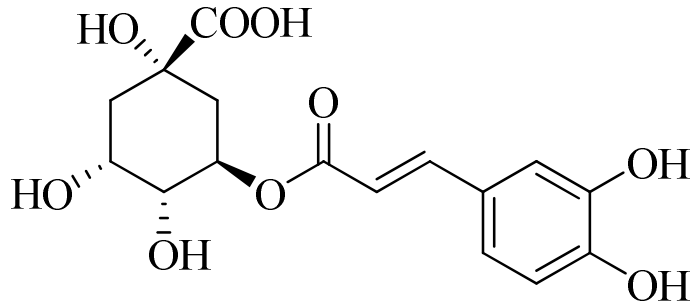
anjyogenez hücre dışı matriks yıkımı, hücre ölümünün düzenlenmesi ve kaserle ilgili buzukluklarda çoklu ilaç direnlerinde rol alan moleküler mekanizmaları etkiler.



Antioksidatif, antihipertansif, anti-inflamatuar, antiproliferatif, antitobmojenik ve antihiperlipidemik v.b. gibi çeşitli etkilere bağlı olarak yeşil çay tüketimi ile kardiyovasküler sağlık arasındaki pozitif ilişki epidemiyolojik ve deneysel çalışmalara dayanarak iyi bir şekilde tespit edilmiştir. Klinik çalışmalar katekinin antioksidan etkilinden dolayı yayarlı olduğunu göstermiştir (Zanwar *et al.* 2014).

Klorojenik asit ((1S,3R,4R,5R)-3-((E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)acryloyloxy)-1,4,5-trihydroxycyclohexanecarboxylic acid):

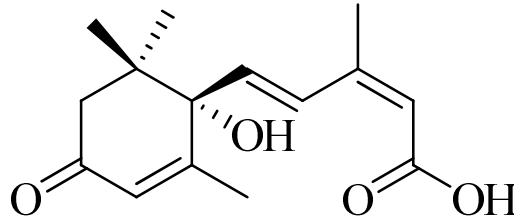
Klorojenik asit, kafeik asit ve kinik asit esteridir. Klorojenik asit, yapraklarda ve çift çenekli bitkilerin meyvelerinden izole edilen kahve içindeki başlıca polifenolik bileşiktir. Uzun zaman bir antioksidan olarak bilinen bu bileşik, bir yemekten sonra glikozun kan dolaşımına salınmasını da yavaşlatır.



Kahve önemli miktarda klorojenik asit sağlayan kimyasalların karmaşık bir karışımıdır. 200 ml'lik bir fincan kahvenin klorojenik asit içeriğinin, yaklaşık 35-175 mg kafeik asit sağlayacak olan 70-350 mg arasında olduğu bildirilmiştir. Epidemiyolojik araştırmanın sonuçları, kahve tüketiminin, tip 2 diabetes mellitus, Parkinson hastalığı ve karaciğer hastalığı (siroz ve hepatosellüler karsinom) dahil olmak üzere çeşitli kronik hastalıkların önlenmesine yardımcı olabileceğini göstermektedir. İleriye dönük kohort çalışmalarının

çoğunda kahve tüketiminin önemli ölçüde artmış kardiyovasküler hastalık riski ile ilişkili olmadığı bulunmuştur. Bununla birlikte, kahve tüketimi, kan basıncı ve plazma homosistein dahil olmak üzere çeşitli kardiyovasküler hastalık risk faktörlerindeki artışlarla ilişkilidir. Şu anda, kahve tüketiminin kanser riskini artırdığına dair çok az kanıt vardır (Higdon and Frei 2006).

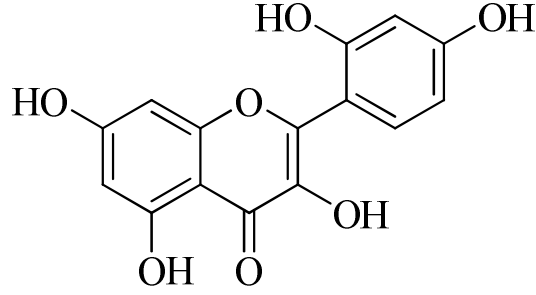
Absisik asit ((2Z,4E)-5-((S)-1-hydroxy-2,6,6-trimethyl-4-oxocyclohex-2-enyl)-3-methylpenta-2,4-dienoic acid): İsoprenoid bir bitkisel hormon olan absisik asitin esas görevi bitkilerde absisyonu (yaprak dökümünü) sağlamaktır. Ayrıca bu hormonun bitkilerdeki seviyesi hastalık yapıcı etkileri ve çevresel koşulların sebep olduğu streside gösterir. Absisik asit bitkilerde terminal tomurcuklarda üretilir. Bitkinin gelişmesini yavaşlatır ve kışın mevsiminde soğuk havada kuru dalların uçlarındaki tomurcukların korunmasında etkilidir. Bu hormon kış mevsimi süresince bitkilerdeki vasküler kambiyum hücrelerindeki gelişmelere engel olarak primer ve seconder büyümeyi yavaşlatır ve kış mevsimi süresince düzenlenmeyi sağlar.



Absisik asit ayrıca bitkilerin çeşitli çevresel koşullarla strese maruz kaldıklarında bitki kök bölgesinde de üretilir. ABA bitkilerde stoma hücrelerinin büzülüp kapanmasını sağlayarak, su bakımından fakir ortam koşullarında su kaybını engellemek için terlemeyi azaltır (Hopkins and Hüner 2004).

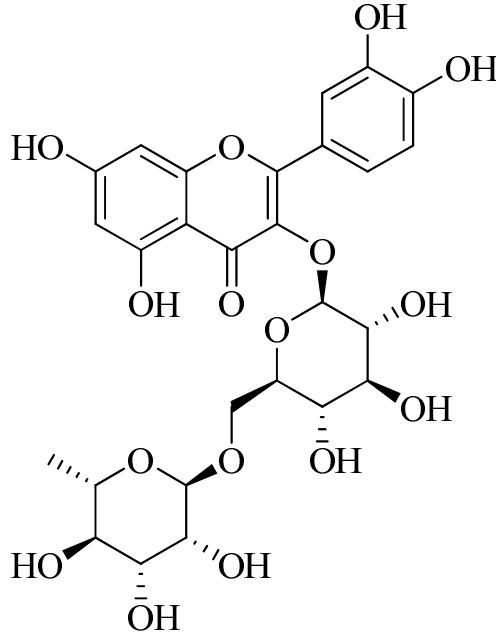
Morin(2-(2,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one):

Flavonoller grubuna ait bir flavonol üyesi olan morin, nükleik asitler, enzimler ve protein ile etkileşerek önemli bir biyoaktif bileşiktir. Morin portakal, badem, incir, soğan ve elma gibi gıdalarda bulunur ve bitkisel ilaçlar olarak kullanılır.



Morinin antioksidan, anti-mutageniz, anti-enflamasyon, anti-neoplastik, kardiyoprotektif aktiviteler, antikanser gibi çeşitli biyolojik ve biyokimyasal etkilere sahip olan ve güçlü bir antioksidan olarak hareket ettiği ve metal iyonu şelatlama kapasitelerine sahip olduğu gösterilmiştir. Dahası, morin bir *in vitro* ve *in vivo* olarak oral karsinogeneze karşı kemopreventif ajan ve ayrıca anti-tümör ilaçlar olarak morin ve ilgili bileşiklerin önemi yaygın bir şekilde bilinmektedir (Subash and Subramanian, 2009).

Rutin:Rutin, antialerjik, anti-enflamatuar, antiproliferatif ve antikanserojenik özellikler dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu bilinen bir flavonoidir.



Rutin kalın bağırsağa bir quersetin dağıtıcı olarak davranır; dahası, kuersetin, kalın bağırsakta yoğun bir şekilde metabolize edilir, bu da rutin ve / veya onun kolonik metabolitlerinden kurtulan kuersetinin bir rol oynayabileceğini gösterir(Kim *et al.* 2004).

KAYNAK ÖZETLERİ

Karbonik anhidraz enzimi, 1933 yılında Meldrum ve Roughton ile Stadie ve O'Brien tarafından ve birbirlerinden ayrı olarak keşfedilmiştir. Meldrum ve Roughton 1933 yılında sığır eritrositinden hazırladıkları karbonik anhidrazın %70 saflıkta olduğunu söylediler. Fazla miktardaki hemoglobini uzaklaştırmak için hemolizat hazırlarken etanol ve kloroform kullandılar. Daha sonraki saflaştırmaları tuz çöktürmesi ve jel adsorbantlar ile protein karışımına uygulayarak klasik teknikler kullanarak gerçekleştirmeye çalıştılar. 1930 ve 1940 yılları boyunca diğer memelilerin eritrositlerinden karbonik anhidrazı saflaştırmak için benzer yöntemler tanımladılar. Teknik gelişmeler sonradan eritrositlerden karbonik anhidrazı saflaştırmak için yöntemler sağladılar. Böylece Lindskog 1960 da sığır eritrositlerinde elektroforetik olarak ayırt edilen 2 tane karbonik anhidraz enzimi buldular. Bu iki enzim kinetik ve kimyasal olarak çok benzer olmalarına rağmen bu kanıt eritrositlerdeki karbonik anhidraz enzimleri için kural olmayabilir. İnsan, maymun, at, tavşan, gine domuzu (Tappan *et al.* 1964) ve sıçan eritrositlerinde (McIntosh 1969) turnover katsayıları birbirinden farklı en az 2 çeşit CA enzimi olduğu saptanmıştır. Bu izoenzimlerin katalitik aktiviteleri arasındaki farkın büyüklüğüne göre, bu iki CA izoenzimi enzimler arasında eşsiz bir yere sahiptir. 1968 de Furth yapılan aktif bölge kimyası çalışmalarında bu izoenzimlerin olası faydalarını keşfetmiştir. 1968 yılında Edsall enzimlerin fizikokimyasal görünüşleri, davranışları ayrıntılı olarak çalışıldı.

1970'li yıllara kadar kandan ve diğer dokulardan CA'yı izole etmek için bir kaç deneme yapıldı. Keilin ve Mann 1940 yılında önce domuz midesinden CA saflaştırmayı denedi ve %30 saflıkta enzim elde etmeyi başardı. Daha sonraları 1963 yılında Sen, Drance ve Woodford sığır lens ekstraktından 2 enzim fraksiyonu elde ettiler, fakat enzimi saflaştıramadılar. 1967 yılında Byvoet ve Gotti enzimi köpek böbreğinden kısmen saflaştırdılar ve 1969 yılında McIntosh sıçan dorsolateral prostat bezlerinden iki çeşit CA enzimini homojen bir saflıkta elde etmiştir.

Demir vd. 2004 yılında sığır midesinden CA enzimini saflaştırmışlardır, enzimin molekül kütlesi sığır eritrosit CA enzimine çok yakın 30 kDa civarında olduğunu bulmuşlardır.

2006 yılında Söyler tarafından hazırladığı yüksek lisans tezinde Van kedisinin eritrositlerinden CA enzimini saflaştırmış ve enzimin molekül kütlesi 30 kDa olarak bulmuştur.

Bursal 2009 yılında yapmış olduğu doktora çalışmasında kivi meyvesinden CA enzimini CM Sephadex G-25 iyon değişim kromatografisi ve Sephadex G-25 saflaştırma basamakları ile %61,5 verimle ve 5,23 kat olarak saflaştırmış. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ile enzimin molekül kütlesini 66 kDa olarak bulmuştur.

Hisar vd. 2003 yılında gökkuşağı alabalığı eritrositlerinden gerçekleştirdiği bir çalışmada CA enziminin molekül kütlesini hem jel filtrasyon kromatografisi ile hem de SDS-PAGE ile 28 kDa olarak belirlediler. 2011 yılında Kılıç yaptığı yüksek lisans çalışmasında koyun midesinden CA I ve CA II izoenzimlerini saflaştırdı. Çalışmalarında CA II izoenzimini %78 verimle 529,4 kat saflaştırdı. Enzimin molekül kütlesini poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile enzimin molekül kütlesini 26,7 kDa olarak belirlediler.

Demirdağ *et al.* 2011 yılında koyun karaciğer dokusundan CA II izoenzimini %72 verimle, 2320 EU/mg spesifik katsayısıyla 203,5 kat enzim saflaştırmışlardır ve enzimin molekül kütlesini yaklaşık 29 kDa olarak buldular.

Yaylacı 2009 yılında doktora tezi çalışmasında ilk defa mersin alabalığı eritrositlerinden CA enzimini saflaştırıp karakterizasyon çalışmasını yaptılar. Sepharose-4B-L tirozin-sülfanilamid kolonundan enzimi %29 verimle 539 kat saflaştırdılar. Enzimin molekül kütlesini, saflığını kontrol etmek için SDS-PAGE yapılmış ve enzimin molekül kütlesini 29 kDa olarak buldular.

Şu ana kadar CA izoenzimleri pek çok hayvan dokusundan ve bitki türünden saflaştırılıp karakterize edildi. 1982 yılında Whitney ve Brigle sığır akciğerinden membrana bağlı karbonik anhidraz enzimini saflaştırdılar ve molekül kütlesini 52 kda civarında buldular. Saflaştırılan enzimin glukozamin galaktoz ve siyalik asit içerdiğini ve en az %20 sinin karbon hidrat olduğu bulunmuştur. 1990 yılında Zhu ve Sly insan akciğerinden karbonik anhidraz IV izoenzimini saflaştırdılar. İnsan akciğer CA IV ünün molekül kütlesini 35 kda civarında olduğunu ve oksijen ve azot bağlı oligosakkarit zinciri içermediğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca CA IV'ün yüksek aktivitesi, halojen tuzlarına dayanıklılığı ve sülfonamidlere olan ilgisinden dolayı CA II ye benzediğini bulmuşlardır.

Flavonoidlerle yapılan ilk biyolojik aktivitelerde kılcal damar duvarlarına olumlu etki gösterdiği belirlenmiştir (Ruzsnyak and Szent 1936). Bu maddelerin kılcal damara pozitif etkisi, genellikle kan sızdırmanın engellenmesinde, geçirgenliğin ve kırılğanlığın ortadan kalkması yönünde etki göstermiştir (Jeney and Uri 1954).

Flavonoidler damarlara etkileri ile beraber, zayıf kardiyotonik (kalp kuvvetlendirici) maddelerdirler. Başka bir araştırmaya göre kuersetin, rutin ve flavonoller nabızı normalleştirme ve zayıf olarakta (hipodinamik) kalbi kuvvetlendirme özelliklerine sahiptirler (Jeney and Uri 1954).

Flavonoid maddelerin en kıymetli özelliklerinden biri de, karaciğer fonksiyonuna pozitif etkileridir. Flavonoid maddelerin karaciğerin barbiturat ve arsenik gibi bileşiklere karşı zehirsizlertitilmesi ve safra salgılanmasını hızlandırıcı etki ettikleri belirtilmiştir (Xadjay 1972; Davidovic and Klosterman 1954). Flavonoid maddelerin zehirsizleştirme etkisinin nedenlerinden birinin, idrar söktürücü özellikleri olduğu belirtilmiştir (Borkowski *et al.* 1960; İnan Çakır 2015).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışmasında kullanılan CNBr aktif sefaroze 4B, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), trietanolamin, benzamidin Sigma-Aldrich'ten. Diğer gerekli kimyasalları Merck AG'den temin edilmiştir.

3.1.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Ultra santrifüj	: Beckman Coulter
Soğutmalı santrifüj	: Hermle Z 323 K(Germany)
Spektrofotometre	: Shimadzu (UV-1800)
pH metre	: Schott pH-Meter CG840
Elektroforez tankı	: BIO RAD (dikey)
Buzdolapları	: Arçelik
Peristaltik pompa	: Ismatec
Derin dondurucu	: Beko (-20°C'ye kadar)
Derin dondurucu	: Sanyo Ultra Low (-85°C'ye kadar)

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanmaları

1. 0,2 M NaHCO₃ çözeltisi, pH: 8,7 (Sefaroze 4B matriksinin hazırlanması için kullanılan tampon): 8,4 g NaHCO₃, 450 ml destile su kullanılarak çözüldü, 1 N NaOH ile pH: 8,7'ye ayarlandıktan sonra, sonuç hacmi destile su ile 500 ml'ye tamamlandı.

2. 2.25 mM Tris-HCl / 0,1 M'lık Na₂SO₄ çözeltisi, pH: 8,7 (sentezlenene afinite jelini dengelenmek için kullanılan tampon): 1,514 g Tris, 7,1 g Na₂SO₄ tartıldı, 450 ml destile

edilmiş suda çözölüp daha sonra da 1 N'lik HCl ile pH: 8,7'ye getirilerek sonuç hacim destile su ile 500 ml'ye tamamlandı.

3.25 mM Tris-HCl / 22 mM Na₂SO₄ çözeltisi, pH: 8,7 (hemolizat uygulamasından sonra afinite jelinin yıkanması için kullanılan tampon) 1,514 g Tris, 1562 g Na₂SO₄ tartıldı, 450 ml destillenmiş su ile çözölldü 1 N'lik HCl ile pH: 8,7'ye ayarlandıktan sonra destile su ile toplam çözelti hacmi 500 ml'ye tamamlandı.

4. 0,1 M NaCH₃COO / 0,5 M NaClO₄ çözeltisi, pH: 5,6 (afinite kolonuna bağlanmış olan CA enzimlerinin elüe edilmesi için uygulanan çözelti): 0,347 g NaCH₃COO.3H₂O ve 3,062 g NaClO₄ 40 ml destillenmiş suda çözölldü, 1 N HCl kullanılarak pH: 5,6'ya kadar ayarlandıktan sonra destillenmiş suyla toplam hacmi 50 ml'ye tamamlandı.

5. 0,02 M Tris-SO₄ çözeltisi, pH: 8,0 (Esteraz aktivitesi ve diyalizde kullanılan tampon çözelti): 1,211 g Tris 450 ml destillenmiş su içinde çözölldü, 1 N H₂SO₄ kullanılarak pH'sı 8,0'a ayarlandıktan sonra toplam hacim destillenmiş suyla 500 ml'ye tamamlandı.

6. Numune hazırlanmasında kullanılan tampon: 0,325 ml 1 M'lık Tris-HCl (pH = 6,8) 0,5 ml % 10'luk SDS, 0,5 ml gliserol, 0,5 ml % 0,1'lik Br-timol mavisi bir beherde karıştırıldı, sonsında hacmi destile su kullanılarak 5 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. Hazırlanan bu tampon kullanılmadan hemen önce, 20 / 1 oranında toplam tampon / β-merkaptetanol olacak şekilde çözelti hazırlandı.

7. Poliakrilamid jelinde proteşnlerin yürütölmesinde kullanılan tampon: 3,0 g Tris ile 14,4 g glisin 100 ml destile suda çözölldü, sonrasında üzerine 10 ml % 10'luk SDS çözeltisi eklendi toplam hacmi destile su ile 1 L'ye tamamlandı.

8. SDS-PAGE jelini boyanmak için kullanılan çözelti: 0,1 g Coomassie brilliant blue R-250, % 10 CH₃COOH, % 40 destile su ve % 50 CH₃OH olacak şekilde karışım ihtiyaç kadar hazırlandı.

9. SDS-PAGE’inde jelin yıkanması amacıyla kullanılan çözelti: % 10 CH₃COOH, % 40 destile su ve % 50 CH₃OH olacak şekilde ihtiyaç kadar hazırlandı.

10. SDS-PAGE’inde yürütülen proteinlerin sabitlenmesi amacıyla kullanılan çözelti: % 10 triklorasetikasit, % 40 destile su ve % 50 izopropanol olacak şekilde ihtiyaç kadar hazırlandı.

11. Protein çözeltilerinin kantitatif miktar tayini için kullanılan çözelti: 50 mg coomassie brillant blue G-250, 25 ml % 95’lik etanol kullanılarak çözüldü, hazırlanan çözeltiye de % 95’lik 50 ml fosforik asit eklenerek çözeltinin toplam hacmi, destile su kullanılarak 500 ml’ye tamamlandı.

12. 1 M’lık Tris-HCl pH: 8,8 tampon çözeltisi: 6,05 g Tris 45 ml suda çözülüp 1 M’lık HCl çözeltisi kullanılarak pH: 8,8’e ayarlandı sonrasında destile su ile 50 ml’ye tamamlandı.

13. 1 M’lık Tris-HCl pH: 6,8 tampon çözeltisi: 1,21 g Tris 2,5 ml destile suda çözüldü 1 M’lık HCl çözeltisi kullanılarak pH: 6,8’e ayarlandı sonrasında destile su ile 10 ml’ye tamamlandı.

14. % 0,8-% 30’luk bisakrilamid-akrilamid çözeltisi: 0,08 g bisakrilamid ve 3 g akrilamid alınıp 6,92 ml destile su kullanılarak hazırlandı.

15. 1 g SDS 9 ml destile suda çözülerek % 10’luk SDS çözeltisi hazırlandı.

16. Tez çalışmalarımızda kullanılan kuarsetin, katekin, klojenik asit, absisik asit, morin ve rutin 1mg/ml olacak şekilde DMSO ile çözülerek stok çözeltileri hazırlandı. Daha sonra çalışmalarda saf su ile 10.000 kat seyreltilerek kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Protein Tayini

3.2.1.a. Kalitatif Olarak Protein Tayini

Proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin amino asitlerinin 280 nm’de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanmaktadır (Segel 1968). Bu metodla afinite kromatografisinde elde edilen bütün fraksiyonların kalitatif olarak protein tayinleri yapıldı.

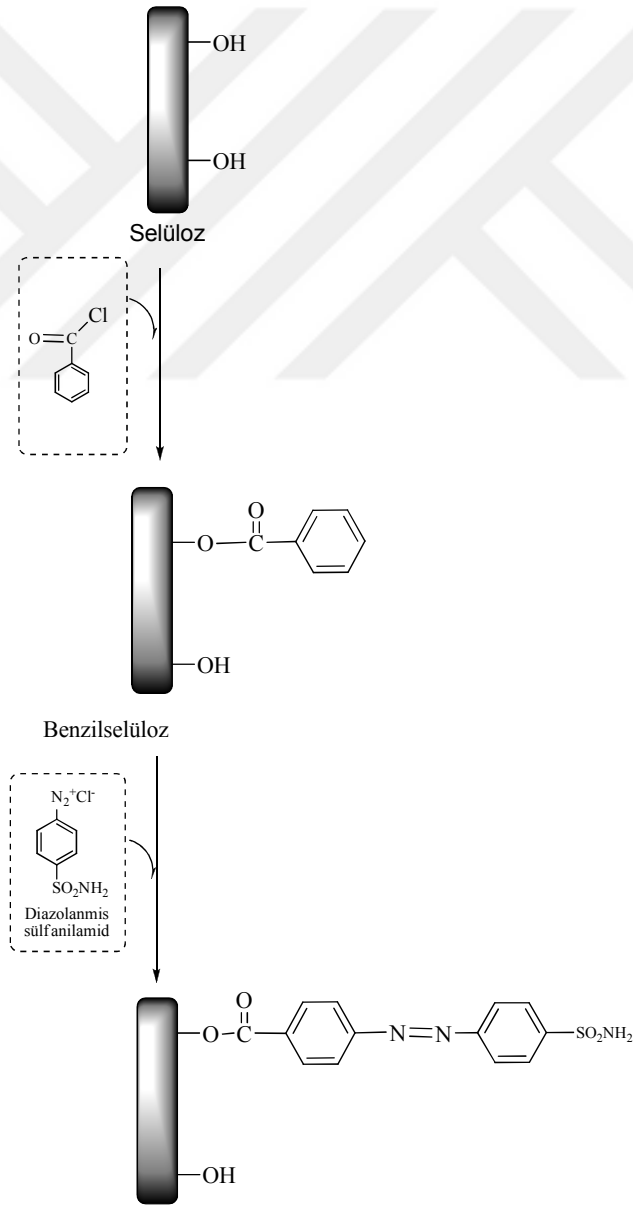
3.2.1.b. Bradford Yöntemine Göre Protein Tayini

Benzilselüloz-sğlfonamid afinitesi kullanılarak elde edilen enzim çözeltisi ve tüm safhalardaki numunelerin protein miktarları bu yöntem kullanılarak tespitedildi. Bu metodun temel prensibi, protein ile coomassie brilliant blue G-250 boyasının kompleks oluşturmasıdır. Oluşan protein-boya kompleksinin maksimum absorbansı 595 nm’de görülür. 15 dakika içerisinde protein-boya kompleksi oluşur. Oluşan bu kompleks çözeltilerde uzun süre kararlı şekilde kalır. Bradford yöntemi olarak bilinen bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg aralığındadır (Bradford 1976).

3.2.2. Karbonik Anhidraz Aktivite Tayini

Karbonik anhidraz enzimi üzerinde yapılan kinetik çalışmalar için aktivitesi ölçümleri estearz yöntemi ile yapıldı. Bu yöntem CA enziminin esteraz aktivitesi göstermesi esasına dayanır. Prensip olarak CA enzimi p-nitrofenil asetatı substrat olarak kullanarak p-nitrofenole hidroliz eder. P-nitrofenol maddesi 348 nm’de maksimum absorbsiyon göstermektedir. ($\epsilon_{348} = 5 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Verpoorte *et al.* 1967).

Esteraz aktivitesi için prosedür şu şekildedir: 0,02 M Tris-SO₄ pH: 8,0 içindeki enzim çözeltisi kuvartz küvetlere konulur ve 300 µl substrat (+inhibitör) konuldu 3 dakika süre ile 25°C’da 348 nm’de köre karşı ölçüm yapıldı. Deneyde kullanılacak p-nitrofenil asetatın günlük taze olmasına özen gösterildi. P-nitrofenil asetat çözeltisi; 13,5 mg katı p-nitrofenil asetat tartılarak 0,5 ml aseton içinde çözüldü ve 24 ml saf suya yavaş yavaş karıştırılarak hazırlandı.



3.2.3. Afinite Kromatografisi Jelinin Hazırlanması

Ticari olarak alınan selüloz 2 g tartılır ve ilk olarak CH_2Cl_2 içerisine alındı sonrasında 100 μl benzoilklorür eklendi 1 gün süre ile karışmaya bırakıldı. Sonra çözücüsü süzülüp uçuruldu. Elde edilen benzoilselüloz saf su ve sonrasında da 0,05 M Tris- SO_4 pH: 8,0 tampon çözelti ile yıkandı. Daha sonra diazolan sülfanilamid uzantı kolu eklenmiş matrikse kenetlendirildi. Sülfanilamid, karbonik anhidraz izoenzimlerinin spesifik ve dönüşümlü bir inhibitörüdür, afinite jelinin yapısına girerek CA enzimlerini yüksek oranda saflaştırılması amacıyla kullanıldı (Pocker and Sarkanen 1979).

Sülfanilamid kenetlendirilmesi: 50 mg sülfanilamid, 0°C civarında 10 ml 1 M HCl içinde çözüldü ve içerisinde 150 mg NaNO_2 bulunan 0°C 'deki 5 ml çözelti, sülfanilamid çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakikalık reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan sülfanilamid 40 ml Sepharose-4B-tirozin süspansiyonuna ilave edildi. pH, 1 M NaOH ile 9,5'a çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaşça karıştırıldı. Daha sonra 1 litre saf su ve 200 ml 0.05 M Tris- SO_4 (pH: 7,4) tamponuyla yıkandı. Yıkandıktan sonra üzerine bir miktar daha aynı tampondan konularak saklandı.

3.2.3.a. Afinite Kolonunun Paketlenmesi

Elde edilen afinite jeli dengeleme tamponunun (Tris-HCl, pH: 7,8) içerisine alınarak afinite jeli süspanse edildi ve daha sonra su trombu yardımı ile vakumlanarak benzilselüloz-sülfanilamid partiküllerinin havası alındı. Süspanse edilmiş afinite jeli, içerisinde dengeleme tamponu bulunan 1×10 cm'lik kapalı sistem cam kolona peristaltik pompa yardımı ile dikkatlice paketleni. Afinite jelini pakettikten sonra peristaltik pompa kullanılarak önce yıkama ve daha sonra da dengeleme tamponu ile yıkandı.

3.2.4. Sığır Böbrek Karbonik Anhidrazın İzolasyonu

Sığır böbreği Ağrı merkez mezbahanesinden taze olarak elde edildi, soğuk zincir uygulanarak laboratuvara getirildi ve kullanılabileceği kadar -20°C de saklandı. 5-6 gr çözünmüş böbrek bıçak yardımıyla küçük parçalara ayrıldı. Parçaları havana konulup sıvı azot ile parçalandı. Sonra mikserde öğütüldü, öğütülmüş sığır böbreği 25-30 ml fosfat tamponu ile falkon tüp'e alıp 10 000 xg' de 10 dk boyunca santrifüj edildi. Pelet (organeller ve diğer hücre atıkları) uzaklaştırıldı. Süpernatant kısmı yeni bir falkon tüpe damlalık yardımıyla aktarıldı. Çökelek kısmı atık tankına atıldı. Süpernatant kısmının pH'sı katı Tris kullanılarak 7,8'e ayarlandı. pH'sı ayarlanan homojenet damlalık yardımı ile dikkatlice afinite kolonuna uygulandı.

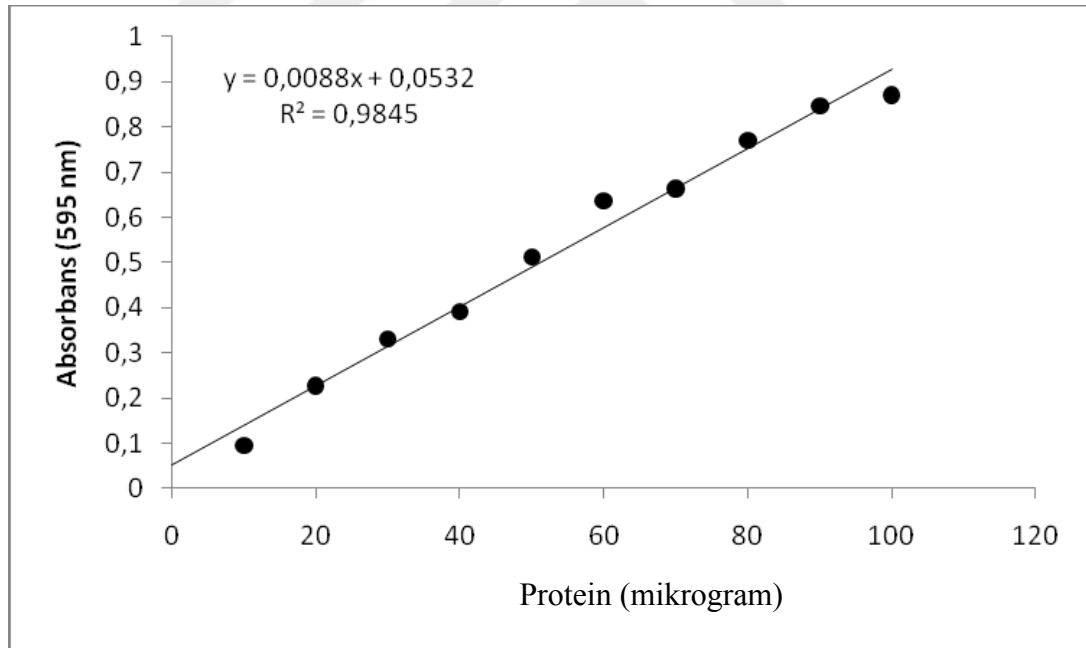
3.2.6. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi İle Enzim Saflığının Kontrolü

Karbonik anhidraz izoenzimi saflaştırıldıktan sonra % 3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli yöntemi yardımı ile enzim çözeltilerinin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli 1970).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini

Çalışmada kullanılan ve işlemler sonucunda saflaştırılan protein çözeltileri Bradford yöntemi kullanılarak kantitatif protein tayinleri yapıldı. Bu amaçla önce standart grafik hazırlandı. Elde edilen enzim çözeltilerindeki protein tayinleri Bradford yöntemiyle yapıldıktan sonra bu standart grafikten (Şekil 4.1) faydalanılarak protein miktarları hesaplandı.



Şekil 4.1. Bradford metoduyla kantitatif tayin için kullanılan standart protein grafiği

Sığır böbrek dokusundan saflaştırılan karbonik anhidraz enzimi için saflaştırma tablosu hazırlandı (Çizelge4.1). Sığır böbrek CA enzimi % 30.83 verimle, 2055,56 EU/mg spesifik aktivite ile 139,45 kat saflaştırıldı.

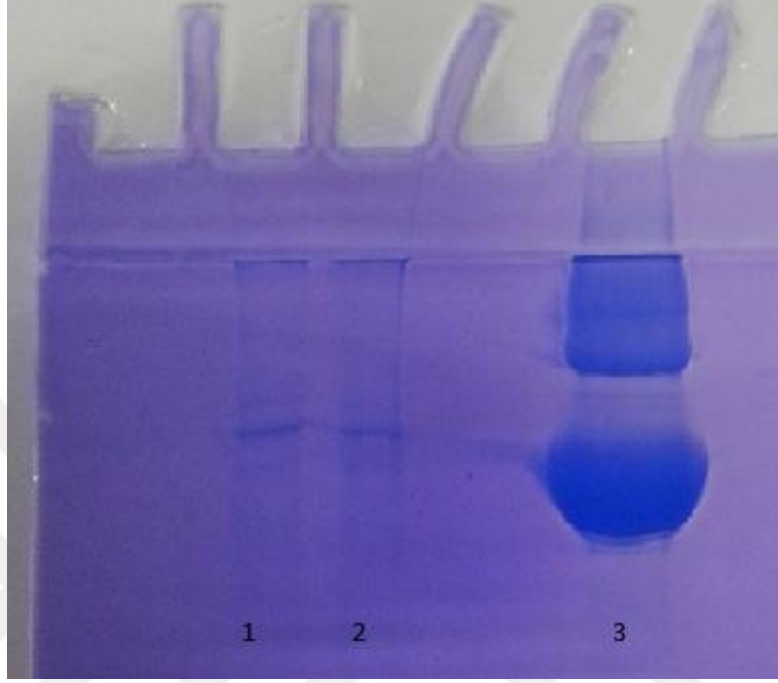
Çizelge 4.1. Sığır böbreğinden CA enziminin benzoilselüloz-sülfanilamid afinitesi ile saflaştırılma sonuçları

Numune türü	Aktivite (EÜ/ml)	Toplam hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite	Spesifik aktivite (EÜ/mg)	% verim	Saflaştırma katsayısı
Homojenat	120	25	8,14	203,5	3000	14,74	100,0	1,0
Sığır Böbrek CA	185	5	0,09	0,45	925	2055,56	30,83	139,45

4.2. Enzim Saflığının SDS-PAGE ile Kontrolü

Sığır böbrek dokusundan saflaştırılan enzim numunelerinin saflık kontrolünü Laemmli metoduna göre %3-8 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) kullanılarak yapıldı (Laemmli 1970).

Benzoilselüloz-sülfanilamid afinite kromatografisinden saf olarak elde edilen sığır böbrek CA izoenzimi ve standart proteinler, Bölüm 3.2.6’de anlatıldığı şekilde elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra elde edilen protein bantlarının fotoğrafı çekildi ve saflaştırılan CA izoenzimlerinin molekül kütleleri log MK-Rf grafikleri çizilerek bu grafiklerden hesaplandı (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. SDS- PAGE fotoğrafı 1 ve 2 nolu kuyu (sığır böbrek karbonik anhidraz) 3 Standart proteinler (66 kda, 45 kda, 29 kda).

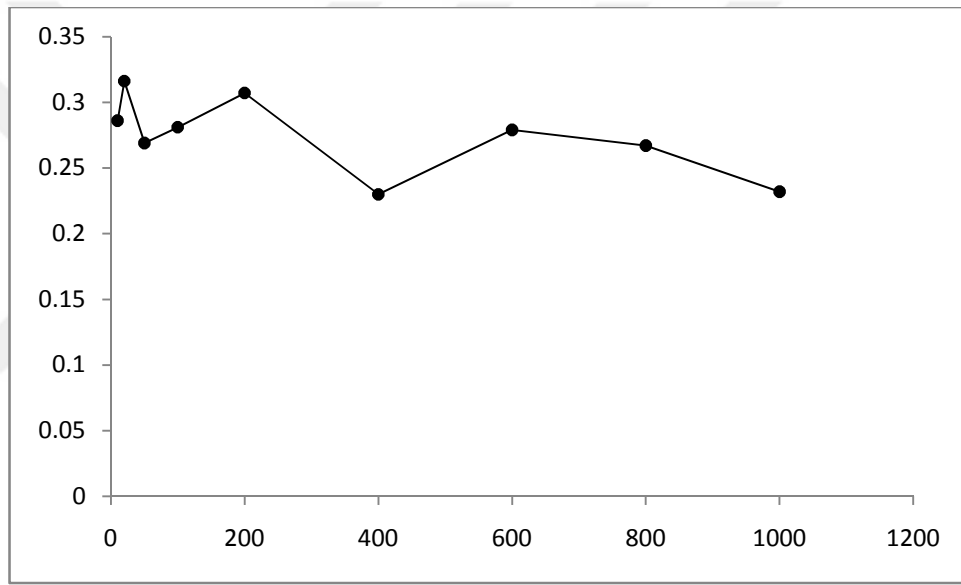
4.3. Sığır Böbreğinden Saflaştırılan Karbonik Anhidraz Enzimi için Kinetik Çalışmalar

4.3.1. Sığır Böbrek Dokusundan Saflaştırılan Karbonik Anhidraz İzoenzimi için Optimum İyonik Şiddet Çalışması

Sığır böbreğinden elde edilen CA enziminin aktivitesi için en uygun iyonik şiddet değerinin tespiti için daha önceki çalışmalarla karbonik anhidraz izoenzimleri için uygunluğu belirlenen değişik konsantrasyonlardaki Tris-SO₄ tamponunun optimal pH'daki çözeltileri hazırlandı. Farklı Tris-SO₄ konsantrasyonlarında esterase aktivite ölçümleri yapılarak Tris-SO₄ konsantrasyonları ile aktivite değerlerinden arasındaki farklanmayı gösteren grafik çizildi. (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.3). Yapılan çalışmalar sonucu sığır böbrek CA enzimi için en uygun iyonik şiddetin 20 mM Tris-HCl pH: 8,0 tamponu olarak tespit edildi.

Çizelge 4.2. Sığır böbrek CA enziminin optimum iyonik şiddetini belirlemek için Tris-HCl tampon çözeltisi kullanılarak yapılan aktivite ölçüm sonuçları

Tris-SO ₄ derişimi (mM)	10	20	50	100	200	400	600	800	1000
Aktivite (EÜ/ml)	0,286	0,316	0,269	0,281	0,307	0,23	0,279	0,267	0,232



Şekil 4.3. Tris-SO₄ tampon çözeltileri kullanılarak Sığır böbrek CA enziminin optimum iyonik şiddeti için değişim grafiği.

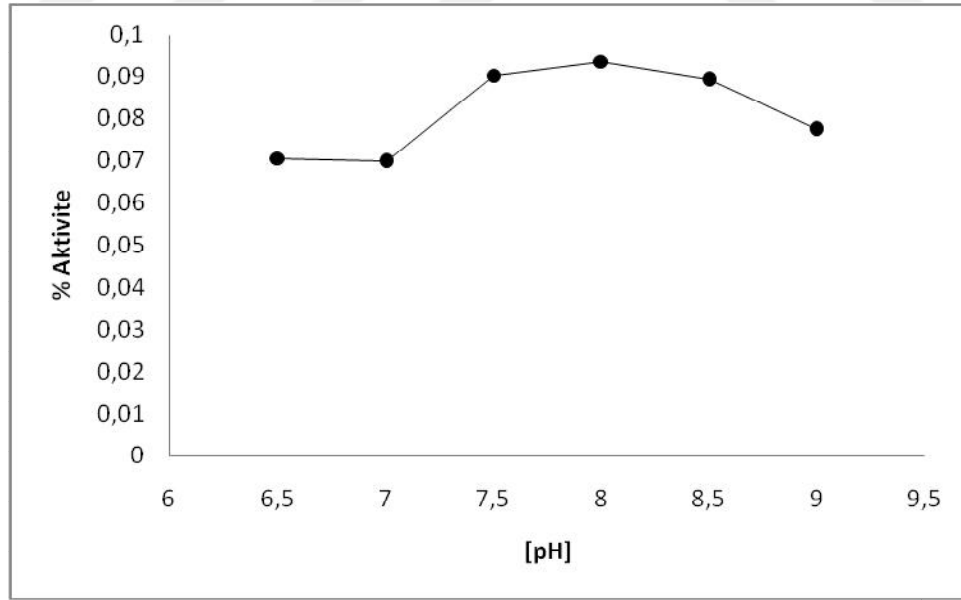
4.3.2. Sığır Böbreğinden Saflaştıırılan Karbonik Anhidraz Enzimi İçin Optimum pH Çalışması

4.3.2.a. Tris-SO₄ İçin Optimum pH Çalışması

Sığır böbrek CA enziminin optimum pH'sı 6,5-9,0 aralığında 20 mM Tris-SO₄ ve pH'sı 5,0-8,0 aralığında olan 50 mM K-fosfat tampon çözeltilerinin yardımı ile enzim aktivitesi esteraz metoduna göre belirlendi (Şekil 4.4-4.5 ve Çizelge 4.3-4.4). Sığır böbreği CA enzimi için optimum pH 20 mM Tris-SO₄ pH: 8,0 tamponu olarak belirlendi.

Çizelge 4.3. 20 mM Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak sığır böbrek CA enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	Aktivite (EÜ/ml)
6,5	0,0705
7,0	0,0697
7,5	0,0903
8,0	0,0936
8,5	0,0892
9,0	0,0773

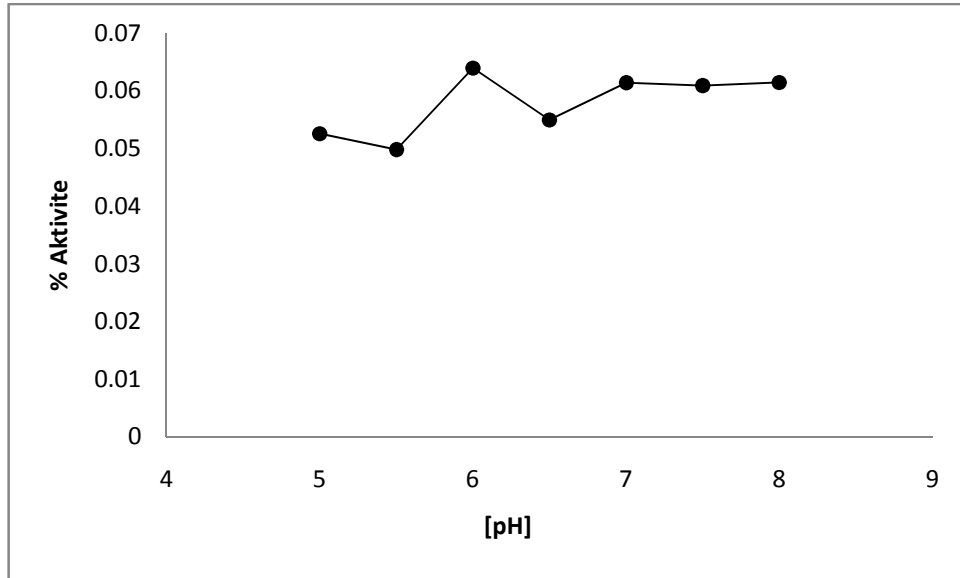


Şekil 4.4. 20 mM Tris-SO₄ Tampon çözeltileri kullanılarak sığır böbrek CA enzimi için yapılan optimum pH-aktivite grafiği

4.3.2.b. KH₂PO₄ Tamponu İçin Optimum pH Çalışması

Çizelge 4.4. 20 mM KH₂PO₄ tampon çözeltisi kullanılarak sığır böbrek CA enziminin optimum pH'sı için yapılan aktivite ölçüm sonuçları

pH	Aktivite (EÜ/ml)
5,0	0,0526
5,5	0,0498
6,0	0,0640
6,5	0,0550
7,0	0,0614
7,5	0,0609
8,0	0,0615



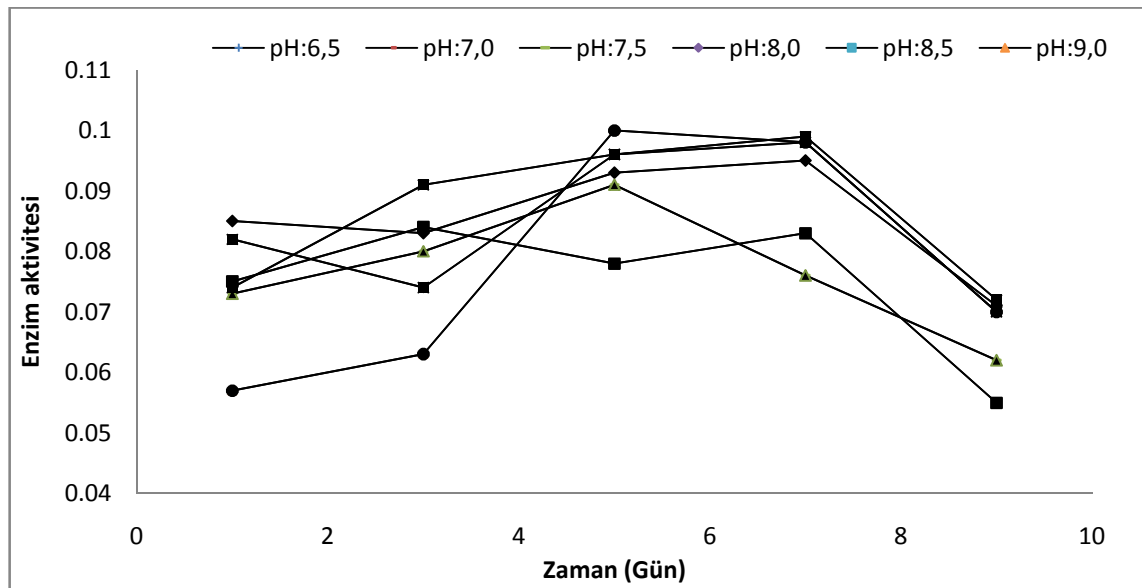
Şekil 4.5. 20 mM KH₂PO₄ tampon çözeltileri kullanılarak sığır böbrek CA enzimi için yapılan optimum pH-aktivite grafiği.

4.3.4. Stabil pH Çalışması

Sığır böbrek CA enzimi optimum pH'sı önceden anlatıldığı gibi şekilde; pH 'ları 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 ve 9.0 aralığında 20 mM Tris-SO₄ tamponu kullanılarak enzim aktivitesi esteraz metodu yardımı ile ölçüldü (Şekil 4.6 ve Çizelge 4.5). Sığır böbrek CA enzimi için stabil pH, 20 mM Tris-SO₄ tamponu pH: 7,5 olarak belirlendi.

Çizelge 4.5.Sığır böbrek CA enziminin stabil pH'sı için 20 mM Tris-SO₄tamponuyardımları ile ölçülen aktivite sonuçları

Zaman(gün)	1	3	5	7	9
Enzim Ünitesi	0,085	0,083	0,093	0,095	0,071
	0,075	0,084	0,078	0,083	0,055
	0,073	0,080	0,091	0,076	0,062
	0,074	0,091	0,096	0,099	0,072
	0,082	0,074	0,096	0,098	0,070
	0,057	0,063	0,100	0,098	0,070



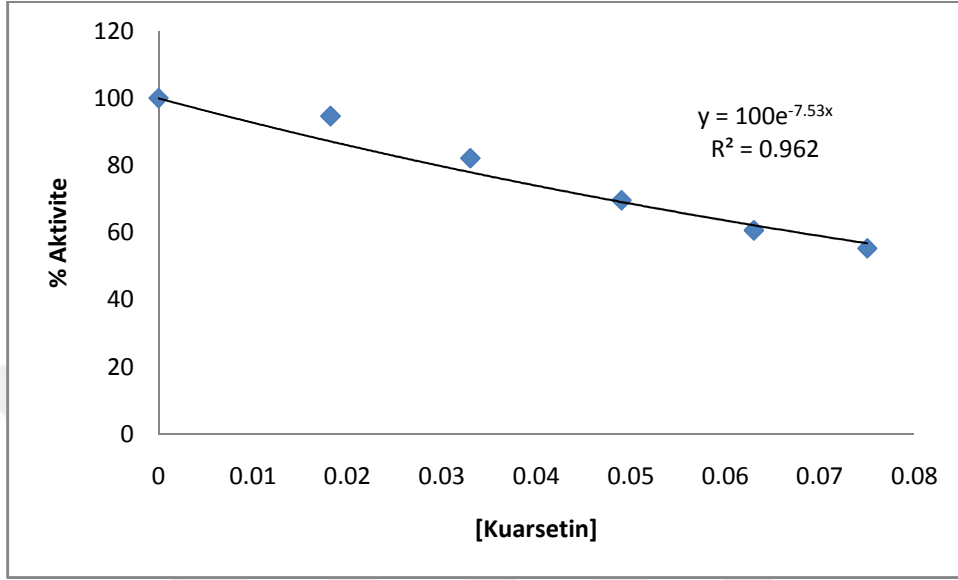
Şekil 4.6. Değişik pH'lardaki 20 mM Tris-SO₄ tampon çözeltisi kullanılarak sığır böbrek CA enzimi için elde edilen stabil pH grafiği

4.3.4. Sığır Böbreğinden Saflaştırılan Karbonik Anhidraz Enzimi Üzerine Flavonoitlerin Etkilerinin Esteraz Metodu ile Bulunması

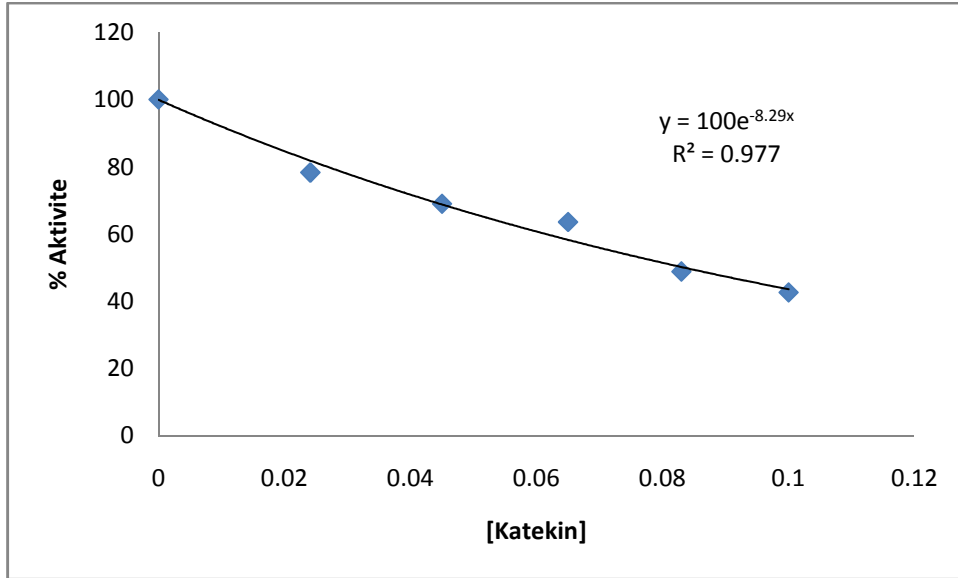
0,005-0,1 M arasında kuarsetin, katekin, klorojenik asit, absisik asit, morin ve rutin doğal hidroksilli maddelerinin stok çözeltileri hazırlandı. Sığır böbrek dokusundan Benzilselüloz-sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz enzimi için altı farklı fenolik maddenin etkileri esteraz aktivitesi yöntemi kullanılarak incelendi. Bu maddelerin hepsi inhibisyon etkisi gösterdi. İnhibisyon etkisi gösteren her bir doğal madde için % Aktivite-[I] grafiği çizildi (Şekil 4.7-4.12). Daha sonra bu grafiklerden %50 inhibisyona sebep olan fenolik madde miktarı (IC₅₀ değerleri) hesaplandı (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Sığır böbrek CA izoenzimi üzerine hidrataz aktivitesi yöntemi ile bazı Flavonoitlerin etkileri ve IC₅₀ değerleri

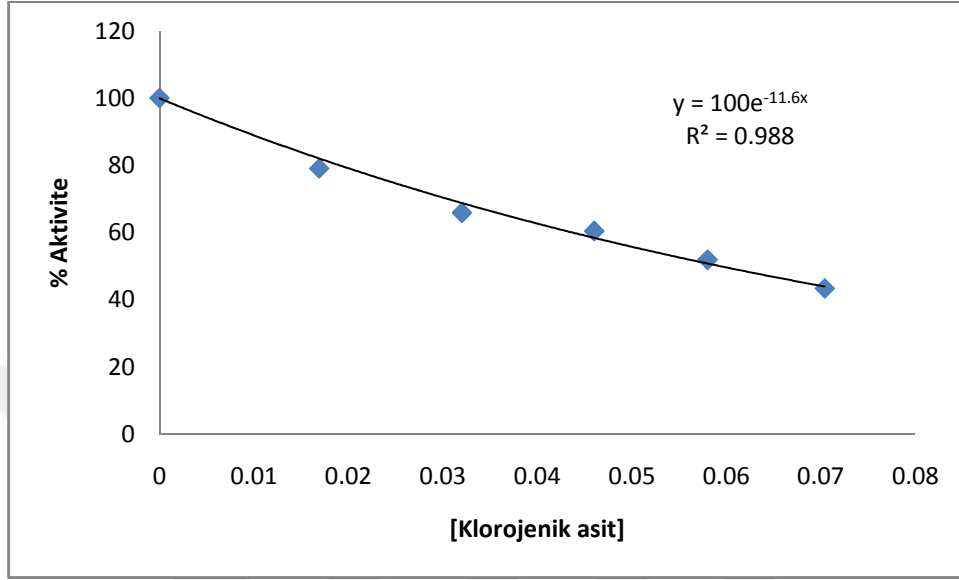
İnhibitör Cinsi	Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkileri	IC ₅₀ (μM)
Kuarsetin	İnhibe etti	0,092
Katekin	İnhibe etti	0,084
Klorojenik asit	İnhibe etti	0,059
Absisik asit	İnhibe etti	0,175
Morin	İnhibe etti	0,117
Rutin	İnhibe etti	0,074



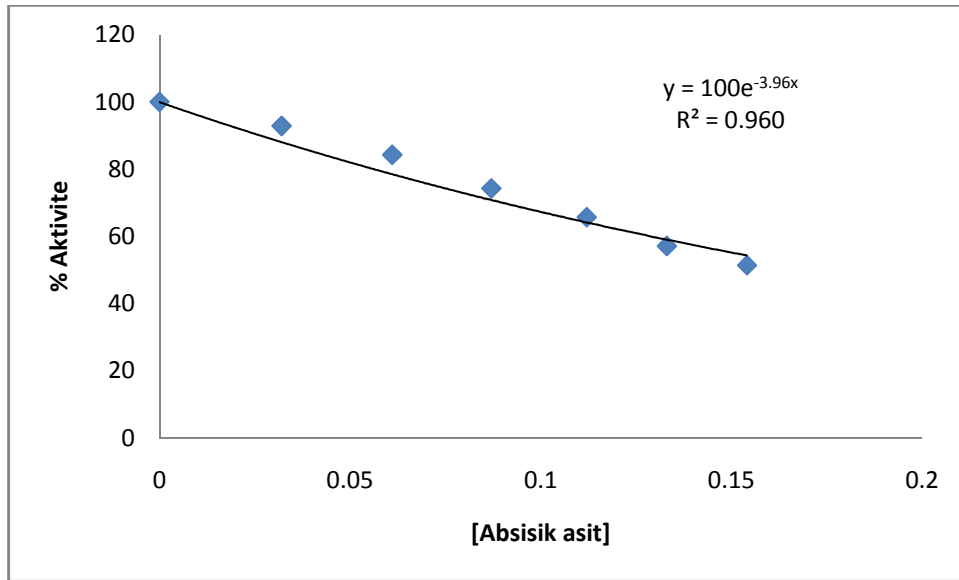
Şekil 4.7. Kuarsetin'nin sığır böbrek CA enzimi aktivitesi üzerine etkisinin %Aktivite-[kuarsetin] grafiği.



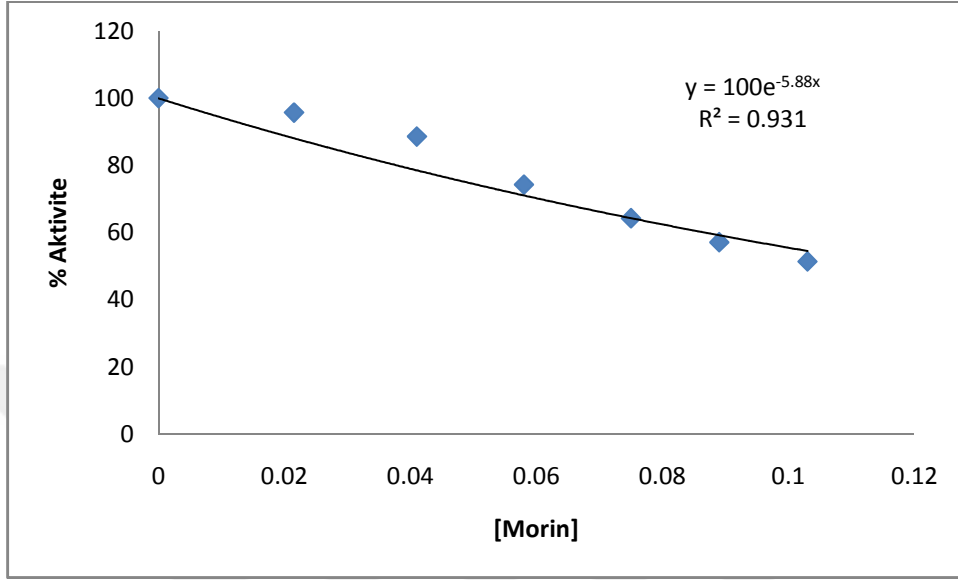
Şekil 4.8. Katekin'nin sığır böbrek CA enzimi aktivitesi üzerine etkisinin %Aktivite-[Katekin] grafiği.



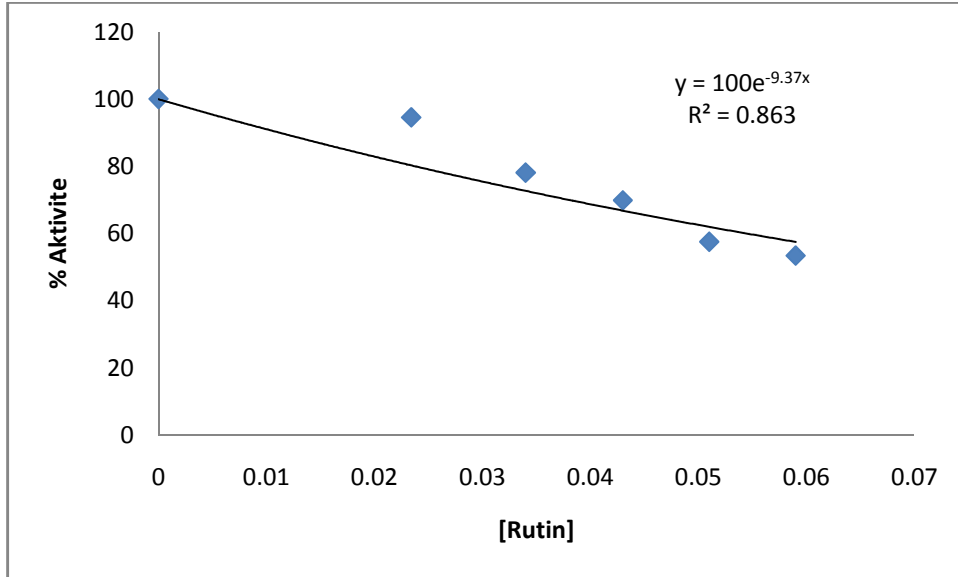
Şekil 4.9. Klorojenik asit'in sığır böbrek CA enzimi aktivitesi üzerine etkisinin % Aktivite-[Klorojenik asit] grafiği.



Şekil 4.10. Absisik asit'in sığır böbrek CA enzimi aktivitesi üzerine etkisinin % Aktivite-[Absisik asit] grafiği.



Şekil 4.11. Morin'in sığır böbrek CA enzimi aktivitesi üzerine etkisinin %Aktivite-[Morin] grafiği.



Şekil 4.12. Rutin'in sığır böbrek CA enzimi aktivitesi üzerine etkisinin %Aktivite-[Rutin] grafiği.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Karbonik anhidraz (CA) her yerde bulunan bir enzim CO₂ in hidrasyon ve dehidrasyon reaksiyonunu dönüşümlü olarak katalizler. Bu enzim hemen hemen yaşayan tüm organizmalarda bulunur, bununla birlikte memelilerde yalnız α -CA gen ailesi üyeleri bulunur (Chegwidden and Carter 2000; Hewett and Emmett 2000). Şu ana kadar subselüler yerleşim, biyokimyasal özellikleri ve onların sekansları aracılığıyla memelilerde 16 farklı CA izoenzimi belirlendi. Ek olarak son zamanlarda memeli olmayan omurgalılarda birkaç yeni izoenzim belirlendi (Esbaugh and Tufts 2006).

CA ilk olarak memeli eritrositlerinden izole edilmiştir. Daha sonraki yıllarda enzim, insan eritrositleri, balık eritrositleri, sıçan eritrositleri, sıçan tükürüğü, sığır kemiği, çeşitli bakteriler ve bitki kaynaklarından saflaştırılmış ve birçok kaynaktan karakterize edilmiştir. Enzimin memelilerdeki molekül kütlesi 30.000 Da civarında olduğu tespit edilmiştir (Feldstein and Silverman 1984; Krungkrai *et al.* 2001; Demir *et al.* 2001). Balık solungacı (Bone *et al.* 1995) ve balık eritrositi (Arena 2002), böceklerden (Sender *et al.* 1999), sığır lökositleri (Gervais and Tufts 1999) gibi çeşitli kaynaklardan saflaştırıldı.

Genel olarak α -gen ailesinde CA izoenzimlerinin 3 farklı grubu bulunmaktadır. Bu grupların bir tanesi memelilerde CA I, II, III, V, VII ve XIII izoenzimlerini bulunduran stoplazmik CA ları içerir. Bu izoenzimler mitokondride bulunan CA V in dışında çeşitli dokuların stoplazmasında bulunurlar. İzoenzimlerin bir diğer grubu memelilerde CA IV, IX, XII, XIV ve XV izoenzimlerini içeren membrana bağlı CA'lar olarak adlandırıldı. Bu izoenzimler birçok farklı doku tipinde plazma membranına bağlıdır. En son grup protein bağlı CA olarak adlandırılan CA VIII, X, XI izoenzimlerini içermektedir (Tashian *et al.* 2000). Bu izoenzimlerin klasik CA aktivitelerini-CO₂'nin hidrasyon/dehidrasyonu aktivitesi- kaybettikleri ve bilinen hiçbir fizyolojik fonksiyon göstermedikleri bilinmektedir fakat oldukça korunumlu bir yapıya sahip olmaları omurgalılarda bu izoenzimli çok önemli kılmaktadır (Tashian *et al.* 2000).

Çoğu farklı dokularda, kemik resorpsiyonu kalsifikasyon, iyon tranportu, asit-baz transportu ve birkaç farklı metabolik prosesleri içeren birkaç farklı fizyolojik prosesleri kapsayan çeşitli CA izoenzimleri bulunur. CA nın en önemli ve ençok çalışılan görevlerinden bir tanesi vücut içindeki solunum gazlarının taşınmasıdır (Esbaugh and Tufts 2006).

Asitlerin, bazların, metallerin ve diğer toksik bileşenler formunda ki binlerce kirletici madde nehirlerle, denizlere ve atmosfere bırakılmaktadır ve bu durum doğal dengenin tahribatıyla sonuçlanmaktadır (Çelik *et al.* 1996).

Çinko içeren metaloenzimi her yöne dağılmıştır, CA öncelikle hayvanlarında içeren çoğu yaşayan organizmadan saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir (Bottcher *et al.* 1994; Krunkrai *et al.* 2001; Zhenyan *et al.* 2006). Bu enzim farklı dokularda önemli rol oynar (Supuran *et al.* 2001). Hayvan aleminde bu enzimin literatürde 16 izoenzimi rapor edilmiştir (Nishimori *et al.* 2007). Enzim birçok farklı dokudan saflaştırılmış ve enzim aktivitesi üzerine ilaçların, pestisitlerin ve çeşitli kimyasalların etkileri incelenmiştir (Çelik *et al.* 1996; Innocenti *et al.* 2005). Özellikle insanda çoğu hastalıkta CA izoenzimlerinin inhibisyonu kullanılmaktadır. Bundan dolayı; bu enzim çoğu ilaç için hedeftir. Örneğin, CA nın güçlü inhibitörü olarak asetazolamide, dorzolamide ve brinzolamide olarak bazı sülfonamidler vardır (Arena 2002). Bu CA inhibitörleri göz içi basıncı düşürmektedir, çoğunlukla glukomanın tedavisi için farmakolojik ajanlar kullanılmaktadır (Casini *et al.* 2002; Casini *et al.* 2002).

CA enziminin canlılar için hayati öneme sahip olması ve böbrek dokusunun insanlar için temel besin kaynaklarından olması ve daha önce hiç çalışılmamış olmasından dolayı bu dokuyu tercih ettik. Bu amaçla Ağrı merkez mezbahanesinden alınan taze böbrekler soğuk zincir kuralına göre laboratuvarımıza getirilmiştir. Enzimin saflaştırılması işlemi iki basamakta gerçekleştirildi; 1)Böbrek karbonik anhidraz enzimini elde etmek için böbrek dokusundan homojenatlar hazırlandı 2) Elde edilen homojenat numunesi için hazırlanan benzilselüloz-sülfanilamid afinite kromatografisi

ile saflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Deney aşamasındaki bütün işlemler soğuk ortamda gerçekleştirildi.

CA enzimi şuna kadar birçok dokudan saflaştırılmıştır. CA enziminin molekül kütlesi canlıdan canlıya, dokudan dokuya farklılık göstermektedir. Robert ve Richard 1971 yılında koyun eritrositlerinden kolon kromatografisi ve izoelektrik fokuslamanın kombinasyonlarını kullanarak bir tane büyük ve üç tane küçük bileşenini saflaştırdılar. Bu büyük form deney süresince sedimentasyona tek bir bileşen olarak davrandığını bulmuşlardır ve nişasta jel elektroforezi ile molekül kütlesini 30 000 wt mol olarak gözlemlemişlerdir.

1982 yılında Whitney ve Brigle sığır akciğerinden membrana bağlı karbonik anhidraz enzimini saflaştırdılar ve molekül kütlesini 52 kda civarında buldular. Saflaştırılan enzimin glukoz amin galaktoz ve siyalik asit içerdiğini ve en az %20 sinin karbonhidrat olduğu bulunmuştur. Zhu ve Sly 1990 yılında insan akciğerinden karbonik anhidraz IV izoenzimini saflaştırdılar. İnsan akciğer CA IV ün molekül kütlesini 35 kda civarında olduğunu ve oksijen ve azot bağlı oligosakkarit zinciri içermediğini gözlemlemişlerdir. Sender vd. 1994 yılında fare ve insan iskelet kasında CA IV ün molekül kütlesini 39 kDa olarak bulmuşlardır. Demir vd. 2000 yılında sığır akciğerinden CA IV izoenzimini saflaştırmışlardır. Enzimin molekül kütlesini SDS page ve jel filtrasyon kromatografisiyle 54 ve 29 kda civarında 2 bant olarak belirlemişlerdir.

Karbonik anhidraz (CA) IV fare akciğerinin mikrozomal ve plazma membranından homojenize edilerek saflaştırıldı. Yalnız birtane N-amino asit sekansının insan CA IV ile %55 benzerlik gösterdiği rapor edildi. 39 kda'luk fare enziminden alınan bir monospesifik antikor diğer memeli türlerinden alınan CAIV ile çapraz tepkimeler yapılarak tavşanda üretildi. Bir N bağlı oligosakkarit zinciri içeren fare akciğer CA enzimi glikozidaz ile sindirildiğinde molekül kütlesi 36 000 daltona azaldığı belirtildi. Ayrıca ek olarak oligosakkarit zinciri içeren sekiz tane memeli CA IV ün molekül kütleleri incelendi; sonuç olarak sırasıyla akciğer mikrozomal membranına bağlı enzime peptide-N- glikozidaz ile muameleden sonra koyun, sığır, ve tavşanda 52 000 den

domuz, hint domuzu ve köpekten 42 000 den ve fare ve hemstır dan 39 000 den 36 000 e azaldığı belirlendi (Waheed *et al.* 1990).

2011 yılında Kılıç yapmış olduğu yüksek lisans tezinde koyun midesi CA II izoenzimi için optimum sıcaklık değerini 50 °C olarak beliledi. Hisar ve arkadaşları 2002 yılında gökkuşağı alabalığı eritrositlerinde yaptıkları çalışmada CA enziminin optimum sıcaklığını 25°C olarak buldular.

Koyun böbreği CA II izoenzimi üzerine bir grup metalin etkisi esteraz aktivitesi yöntemi ile belirlenmeye çalışıldı. Bu çalışmada Fe^{+2} , Cu^{+2} , Cr^{+2} , Al^{+3} , Ni^{+2} , Mn^{+2} , Cd^{+2} , Zn^{+2} metalleri kullanıldı. Çalışma sonucunda Cu^{+2} ve Al^{+3} metalleri enzimi inhibe ederken Fe^{+2} 'nin enzimi aktive ettiği görülmüştür. Cu^{+2} ve Al^{+3} sırasıyla IC_{50} değerleri 0,73 ve 0,34 mM olarak belirlenmiştir. K_i değerleri sırasıyla 4,21 ve 0,517 olarak belirlendi her iki metalin inhibisyon çeşidi yarışmasız inhibisyon olarak belirlendi (Demirdağ *et al.* 2013).

Demirdağ vd. 2011 yılında koyun karaciğer dokusundan saflaştırdıkları CA II izoenzimi üzerine bazı metallerin etkisini hem esteraz hemde hidrataz aktivitesi yöntemini kullanarak incelemişlerdir. Esteraz aktivitesi yöntemi ile Zn^{+2} , Cu^{+2} , Cd^{+2} , Al^{+3} metallerinin K_i değerleri sırasıyla 3.91, 1.51, 6.7, 1.34 mM olarak bulmuşlardır ve enzimin yarışma tipi sırasıyla yarı yarışmalı, yarı yarışmalı, yarışmasız, yarı yarışmalı olarak bulmuşlardır. Hidrataz aktivitesi yöntemiyle Zn^{+2} , Cu^{+2} , Cd^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} metallerinin IC_{50} değerleri sırasıyla 0.058, 0.00041, 0.66, 0.75 ve 1.44 mM olarak bulmuşlardır.

Koyun böbreği CA IV izoenzimi üzerine bir grup metalin etkisi esteraz aktivitesi yöntemi ile belirlenmeye çalışıldı. Bu çalışmada Fe^{+2} , Cu^{+2} , Cr^{+2} , Al^{+3} , Ni^{+2} , Mn^{+2} , Cd^{+2} , Zn^{+2} metalleri kullanıldı. Çalışma sonucunda Cu^{+2} ve Al^{+3} metalleri enzimi inhibe ederken Fe^{+2} 'nin enzimi aktive ettiği görülmüştür. Cu^{+2} ve Al^{+3} sırasıyla IC_{50} değerleri 0,23 ve 1,22 mM olarak belirlenmiştir (Demirdağ *et al.* 2013).

Ekinci vd. 2006 yılında insan eritrosit izoenzimlerinden CA I ve CA II üzerine ağır metallerin etkilerini incelediler. HCA II üzerine kurşun, kobalt ve civa ağır metalleri için K_i değerlerini sırasıyla 0.059, 1.382, 0.32 mM olarak buldular. Kurşun HCA II izoenzimini yarışmalı olarak, kobalt yarışmasız, civa yarı yarışmalı olarak inhibe ettiğini buldular.

Bu çalışmada sığır böbrek dokusundan CA enzimi benzilselüloz-sülfanilamid afinite kromatografisi ile saflaştırılarak bazı doğal hidroksilli moleküllerin bu enzim üzerindeki etkilerini CA'nın esteraz aktivite yöntemi kullanılarak incelenmeye çalışılmıştır.

Şu ana kadar literatürde CA izoenzimleri üzerine antibiyotiklerin etkisi üzerine yapılan araştırmaların sayısı çok azdır. Beydemir vd. 2002 yılında gentamisin sülfatın etkisini *in vitro* ortamda hCA I ve hCA II izoenzimleri üzerine etkilerini ve *in vivo* ortamda fareler üzerindeki etkilerini Wilbur ve Anderson'nun hidrataz aktivitesi yöntemini kullanarak incelediler. Sonuç olarak gentamisin sülfatın enzimi *in vivo* ortamda ve düşük konsantrasyonda *in vitro* ortamda enzimi inhibe ettiğini ama yüksek konsantrasyonda *in vitro* ortamda enzimi aktive ettiğini buldular.

Demirdağ vd. 2011 yılında insan hCA I ve hCA II enzimi ile koyun böbreğinden saflaştırdıkları CA enzimi üzerine oksitetrasiklin antibiyotiğinin etkisini esteraz aktivitesi metodu ile incelediler. Oksitetrasiklin antibiyotiğinin her üç enzim üzerinde de aktivasyon etkisi gösterdiğini bulmuşlardır. En güçlü aktivasyon etkisini hCA I üzerinde ve en zayıf aktivasyon etkisini de sCA üzerinde gösterdiğini tesbit etmişlerdir.

Kılınç 2011 yılında yapmış olduğu yüksek lisan tezinde koyun midesinden CA I ve CA II izoenzimlerini saflaştırmış karakterize etmiş bazı ilaçların enzim aktivitesi üzerine etkilerini incelemiştir. SDS-PAGE ile CA II izoenzimin molekül kütlesini 26,7 kDa olarak bulmuşlardır. Kılıç çalışmasında enzim üzerine ilaçların etkisini incelemek için hem hidrataz hem de esteraz aktivitesini kullanmışlardır. Hidrataz aktivitesi metodu ile enroflaksasin, tylosin, ampisilin sodyumun enzimler üzerindeki etkilerini incelemiştir. Sonuç olarak koyun CA II izoenzimi üzerine etki eden ilaçların

IC₅₀değerlerini enroflaksasin, tylosin, ampisilin ilaçları için sırasıyla 2.47, 0.0387, 1.63 mM olarak hesaplamışlardır. Enzimler üzerine kanamisin sülfatın, amikasin sülfatın ve enroflaksasinin etkilerini esteraz aktivite yöntemini kullanarak incelemişlerdir. kanamisin sülfatın, amikasin sülfatın ve enroflaksasin ilaçları için IC₅₀ değerlerini sırasıyla 0.118, 0.0362, K_i değerlerini sırasıyla 0.042± 0.0118, 0.0327±0.0078 mM ve enroflaksasinin CA II izoenzimi üzerinde etki göstermediğini tesbit etmişlerdir.

Son yıllarda artan şekilde doğal fenolik ya da hidroksilli moleküllerin CA izoenzimleri yada diğer önemli enzimler üzerindeki etkileri incelenmektedir. Birçok doğal fenolik maddenin insan karbonik anhidraz izoenzimleri üzerinde sonderece etili oldukarı yapılan çalışmalarda görülmektedir (Senturk *et al.* 2011; Ekinci *et al.* 2013; Guney *et al.* 2015; Turkoglu *et al.* 2017)

Yaptığımız bu tez çalışmasında:

1. Sığır böbreğinden CA enzimi Benzilselüloz-sülfanilamid afinite kromatografisi kulanılarak saflaştırıldı. SDS-PAGE yöntemi ile enzimlerin saflığı ve proteinin molekül ağırlığı belirlendi.
2. Sığır böbreğinden elde edilen CA enzimi % 30,83 verimle, 105,35 EU/mg spesifik aktivite ile 149,15 kat saflaştırıldı.
3. Elde edilen enzim için kinetik çalışmalar yapıldı optimum iyonik şiddet (20 mM Tris), optimum pH (8,0), stabil pH (7,5) değerleri belirlendi.
4. Sığır böbrek CA enzim üzerine bazı doğal hidroksilli moleküllerin esteraz aktivitesi yöntemi ile IC₅₀ değerleri belirlendi.

KAYNAKLAR

- Arena (Applied Research Ethics National Association) (2002) Institutional animal care and use committee guidebook, 2nd ed. Boston, 121-125.
- Bertucci, A., Zoccola, D., Tambutté, S., Vullo, Supuran, C.T., 2009. Carbonic anhydrase activators. The first activation study of a coral secretory isoform with amino acids and amines. *Bioorganic& Medicinal Chemistry*, 18, 2300-2303
- Beydemir, S., Ciftci, M., Kufrevioglu, O.I. and Buyukokuroglu, M.E., 2002. Effects of gentamicin sulfate on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes in vitro and from rat erythrocytes in vivo. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25:966-969.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248.
- Briganti, F., Mangani, S., Orioli, P., Scozzafava, A., Vernaglione, G., Supuran, C.T. 1997. Carbonic anhydrase activators: X-ray crystallographic and spectroscopic investigations for the interaction of isozymes I and II with histamine. *Biochemistry*. 36(34):10384-10392.
- Briganti, F., Mangani, S., Scozzafava, A., Vernaglione, G., Supuran, C.T., 1999. Carbonic anhydrase catalyzes cyanamide hydration to urea: Is it mimicking the physiological reaction ? *J Biol Inorg Chem.*, 4:528– 536.
- Bottcher, K., Waheed, A. and Sly, W.S., 1994. Membrane-associated carbonic anhydrase from the crab gill: Purification, characterization, and comparison with mammalian CAs. *Arch. Biochem. Biophys*, 312, 429.
- Bone, P.F., 1995. Word-of-mouth effects on short-term and long-term product judgments. *Journal of Business Research*, 213-223.
- Borkowski, B., Krug, H., Wroczynski, Biol. Inst. Rosl. 1960; 6-18.
- Bursal E, kivi meyvesinin antioksidan ve antiradikal aktivitelerinin belirlenmesi, karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2009 doktora tezi
- Casini, A., Mincione, F., Vullo, D., Menabuoni, L., Scozzafava, A. and Supuran, C.T., 2002. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, 17, 9.
- Casini, A., Scozzafava, A., Mincione, F., Menabuoni, L. and Supuran, C.T., 2002. Carbonic Anhydrase Inhibitors: Synthesis of Water Soluble Sulfonamides Incorporating a 4-sulfamoylphenylmethylthiourea Scaffold, with Potent Intraocular Pressure Lowering Properties *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 17, 333.
- Celik, I., Camas, H., Arslan, O., Küfrevioğlu, O.I., 1996. The effects of some pesticides on human and bovine erythrocyte carbonic anhydrase enzyme activities in vitro. *J Environ Sci Heal A* , 31:2651–2657.
- Chegwidden, W.R., Carter, N.D., Introduction to the carbonic anhydrases. In: Chegwidden, W.R., Carter, N.D., Edwards, Y.H., 2000. Introduction to the carbonic anhydrases. *The Carbonic Anhydrases: New Horizons*. Birkhauser Verlag Basel, Boston pp. 13–28.

- Christianson, D.W., Fierke, C.A., 1996. Carbonic anhydrase: Evolution of the zinc binding site by nature and by design. *Acc Chem Res.*, 29:331–339.
- Davidovic, P.M., Klosterman, G. F. 1954. *Arch. Dermatol. Und Syphilis.* 199-210.
- Demirdag, R., Sentürk, M., Küfrevioğlu, O.I., 2011. Activatory Effects of Oxytetracycline on Some α -Carbonic Anhydrases. *Hacettepe J. Biol. & Chem.*, 39 (2), 207–212.
- Demirdag, R., Yerlikaya, E., Senturk, M., Kufrevioglu, O.I., Supuran, C.T., 2013. Heavy metal ion inhibition studies of human, sheep and fish α -carbonic anhydrases. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.* 28 (2) 278-282.
- Esbaugh, A.J, Tufts, B.L., 2006. The structure and function of carbonic anhydrase isozymes in the respiratory system of vertebrates *Respiratory Physiology & Neurobiology* 154 185–198.
- Ekinci, D. Fare genomunda bulunan karbonik anhidraz izoenzim ve karboksilaz enzim genlerinin cDNA'larının üretilmesi, antisens mRNA sentezi ve in situ hibridizasyonu ile gen ekspresyon analizi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.
- Ekinci, D., Karagoz, L., Ekinci, D., Senturk, M., Supuran, C.T. 2013. Carbonic anhydrase inhibitors: in vitro inhibition of α isoforms (hCA I, hCA II, bCA III, hCA IV) by flavonoid. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.* 28 (2) 283-288.
- Elleuche, S., Poggeler, S., 2009. Evolution of carbonic anhydrases in fungi. *Curr Genet* 55(2):211-222.
- Esbaugh, A.J., Tufts, B.L., 2006. The structure and function of carbonic anhydrase isozymes in the respiratory system of vertebrates. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 154,185–198.
- Fabre, N., Reiter, I.M., Becuwe-Linka, N., Genty, B., Rumeau, D., 2007. Characterization and expression analysis of genes encoding alpha and beta carbonic anhydrases in Arabidopsis. *Plant Cell Environ*, 30(5):617-629.
- Feldstein, J.B. and Silverman, D.N., 1984. Purification and characterization of carbonic anhydrase from the saliva of the rat. *Journal of Biological Chemistry* 259:5447-5453.
- Gervais, M.R. and Tufts, B.L., 1999. Characterization of carbonic anhydrase and anion Exchange in the erythrocytes of bowfin (*Amia cavla*), a primitive air-breathing fish. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 23:343-350.
- Guerri, A., Briganti, F., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Mangani, S., 2000. Mechanism of cyanamide hydration catalyzed by carbonic anhydrase II suggested by cryogenic X-ray diffraction. *Biochemistry*, 39:12391–12397.
- Guney, M., Cavdar, H., Senturk, M., Ekinci, D. 2015. Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of novel uracil derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 25 (16) 3261-3263.
- Hewett-Emmett D., 2000. Evolution and distribution of the carbonic anhydrase gene families. In: Chegwiddden WR, Edwards Y, Carter N, editors. *The carbonic anhydrases-New horizons*. Basel: Birkhäuser Verlag, pp 29-78.
- Higdon, J. V., Frei, B. 2006. Coffee and health: a review of recent human research. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 46(2):101-123.

- Hilvo, M., Tolvanen, M., Clark, A., Shen, B.R., Shah, G.N., Waheed, A., Halimi, P., Hanninen, M., Hamalainen, J.M., Vihinen, M., Sly, W.S., Parkkila, S., 2005. Characterization of CA XV, a new GPIanchored form of carbonic anhydrase. *Biochem. J.*, 392, 83–92.
- Hopkins, W.G., Hüner, N.P.A., Introduction to Plant Physiology, John Willey and Sons Inc.USA, 2004
- <http://www.buzzle.com/articles/quercetin-benefits.html> (Web erişim tarih: 03.05.2018).
- Innocenti, A., Muhlschlegel, F.A., Hall, R.A., Steegborn, C., Scozzafava, A., Supuran C.T., 2008. Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of the beta-class enzymes from the fungal pathogens *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* with simple anions. *Bioorg Med Chem Lett*, 18(18):5066-5070.
- Innocenti, A., Hall, R.A., Schlicker, C., Muhlschlegel, F.A., Supuran, C.T., 2009. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the beta-class enzymes from the fungal pathogens *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* with aliphatic and aromatic carboxylates. *Bioorg Med Chem* 17(7):2654-2657.
- Innocenti, A., Antel, J., Wurl, M., Vullo, D., Firnges, M.A., 2005. Scozzafava, A. and Supuran, C.T. *Bio.Org. Med. Chem. Lett*, 15, 1909.
- Isik, S., Kockar, F., Arslan, O., Guler, O.O., 2008. Innocenti A, Supuran C.T: Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the beta-class enzyme from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* with anions. *Bioorg Med Chem Lett*, 18(24):6327-6331.
- İnan Çakır, B. 2015. Bazı Flavonoidlerin Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi, Asetilkolinesteraz ve Karbonik Anhidraz Enzimleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Jabusch, J. R., Deutsch, H. F., 1985. Localization of lysines acetylated in ubiquitin reacted with *p*-nitrophenyl acetate *Archives Biochemistry and Biophysics*, 238, 170-177.
- Jeney, E., Uri, J. 1954. The Flavonoids. *Die Pharmazie* 9- 553.
- Johnston, R., 1976. Heavy metal contamination in the sea. *Marine Pollution*, Academic Press, Inc., New York, 185-302.
- Keha, E.E. ve Küfrevioğlu Ö.İ. 2007. *Biyokimya*. Aktif yayınevi, İstanbul, 647pp.
- Kılınç, N., 2011. Karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin koyun midesinden saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı ilaçların enzim aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi.
- Kim, G., Selengut, J., Levine, R.L., 2000. Carbonic anhydrase III: The phosphatase activity is extrinsic. *Arch Biochem Biophys*, 377:334-340.
- Kim, H., Kong, H., Choi, B., Yang, Y., Kim, Y., Lim, M.J., Neckers, L., Jung, Y. 2005. Metabolic and pharmacological properties of rutin, a dietary quercetin glycoside, for treatment of inflammatory bowel disease. *Pharm Res.* 22(9):1499-1509.
- Kimber, M.S, Pai, E.F., 2000. The active site architecture of *Pisum sativum* betacarbonic anhydrase is a mirror image of that of alpha-carbonic anhydrases. *EMBO J*, 19(7):1407-1418.
- Klengel T, Liang W.J, Chaloupka J, Ruoff C, Schroppel K, Naglik JR, Eckert S.E,

- Mogensen, E.G., Haynes, K., Tuite, M.F., Levin, L.R., Buck, J., Muhlschlegel, F.A., 2005. Fungal adenylyl cyclase integrates CO₂ sensing with cAMP signaling and virulence. *Curr Biol*, 15(22):2021-2026.
- Krungskrai, S.R., Suraveratum, N., Rochanakij, S., and Krungskrai, J., 2001. Characterization of carbonic anhydrase in *Plasmodium falciparum*. *International Journal of Parasitology*, 31:661-668.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.
- Lane, T.W., Saito, M.A., George, G.N., Pickering, I.J., Prince, R.C., Morel, F.M., 2005. Biochemistry: a cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature*, 435(7038):42.
- Lehninger Biyokimyanın İlkeleri David L.Nelson, Michael M. Cox (Çeviri editörü: Nedret Kılıç) Palme yayıncılık 2005
- Lindskog, S., Silverman, D.W., 2000. The catalytic mechanism of mammalian carbonic anhydrases. In: Chegwidan WR, Edwards Y, Carter N, editors. *The carbonic anhydrases-New horizons*; Basel: Birkhäuser Verlag, pp 175–196.
- Macauley, S.R., Zimmerman, S.A., Apolinario, E.E., Evilia, C., Hou, Y.M., Ferry, J.G., Sowers, K.R., 2009. The archetype gamma-class carbonic anhydrase (Cam) contains iron when synthesized in vivo. *Biochemistry*, 48(5):817-819.
- Maren, T.H., Wynns, G.C., Wistrand, P.J., 1993. Chemical properties of carbonic anhydrase IV, the membrane-bound enzyme. *Mol. Pharmacol.* 44, 901–905.
- McIntosh, J. E. A. 1969. Carbonic anhydrase isoenzymes in the erythrocytes and uterus of the rabbit. *Biochem. J.*, 114, 463.
- Mitsuhashi, S., Mizushima, T., Yamashita, E., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Moriyama, H., Ueki, T., Miyachi, S., Tsukihara, T., 2000. X-ray structure of beta-carbonic anhydrase from the red alga, *Porphyridium purpureum*, reveals a novel catalytic site for CO₂ hydration. *J Biol Chem.*, 275:5521–5526
- Mori, N., Uozumi, N., Furuta, H., Hoshikawa, H., 1998. Effect of acetazolamide on cation concentration in the endolymph of the endolymphatic sac. *Acta Otolaryngol*, 533, 12-15
- Nishimori, I., Minakuchi, T., Onishi, S., Vullo, D., Cecchi, A., Scozzafava, A. and Supuran, C.T., 2007. Carbonic anhydrase inhibitors: Cloning, characterization, and inhibition studies of the cytosolic isozyme III with sulfonamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 7229.
- Parisi, G., Perales, M., Fornasari, M.S., Colaneri, A., Gonzalez-Schain, N., Gomez-Casati, D., Zimmermann, S., Brennicke, A., Araya, A., Ferry, J.G., Echave, J., Zabaleta, E., 2004. Gamma carbonic anhydrases in plant mitochondria. *Plant Mol Biol*, 55(2):193-207.
- Parkkila, A.K., Parkkila, S., Serlo, W., Reunanen, M., Vierjoki, T., 1994. Rajaniemi H., A competitive dual-label time-resolved immunofluorometric assay for simultaneous detection of carbonic anhydrase I and II in cerebrospinal fluid. *Clinica Chimica Acta*, 230, 81-89.
- Parui, R., Gambir, K. K., Mehrotra, P. P., 1991. *Biochem. Int*, **23**, 779-789.
- Parui, R., Gambir, K. K., Cruz, I., Hosten, A. O., 1992. *Biochem. Int*, **26**, 809-820.
- Pocker, Y. and Sarkanen, S., 1979. Carbonic anhydrase: structure, catalytic versatility and inhibition. *Advances in Enzymology*, New York, p. 149-273.
- Ruzsnyak S. and Szent-Gyorgy A. 1936. Vitamin P: flavonoids as vitamins. *Nature*. 138-27.

- Okuyama, T., Waheed, A., Kusumoto, W., Zhu, X.L., Sly, W.S., 1995. Carbonic anhydrase IV: role of removal of C-terminal domain in glycosylphosphatidylinositol anchoring and realization of enzyme activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 320, 315–322.
- Sawaya, M.R., Cannon, G.C., Heinhorst, S., Tanaka, S., Williams, E.B., Yeates T.O., Kerfeld, C.A., 2006. The structure of beta-carbonic anhydrase from the carboxysomal shell reveals a distinct subclass with one active site for the price of two. *J Biol Chem*, 281(11):7546-7555.
- Schlicker, C., Hall, R.A., Vullo D., Middelhaufe, S., Gertz M., Supuran, C.T., Muhlschlegel, F.A., Steegborn, C., 2009. Structure and inhibition of the CO₂-sensing carbonic anhydrase Can2 from the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *J Mol Biol*, 385(4):1207-1220.
- Segel, I. H. 1968. *Biochemical Calculations*, Inc, New York, 403.
- Sender, S., Bottcher, K., Cetin, Y. and Gros, G., 1999. Carbonic anhydrase in the gills of seawater-and freshwater-acclimated flounders *Platichthys flesus*: purification, characterization, and immunohistochemical localization. *Journal of Histochemical Cytochemistry*, 47:43-50.
- Senturk, M., Gulcin, I., Beydemir, S., Kufrevioglu, O.I., Supuran, C.T. 2011. In vitro inhibition of human carbonic anhydrase I and II isozymes with natural phenolic compounds. *Chemical Biology & Drug Design*. 77, 494-499.
- Sly W.S., Hu P.Y., 1995. Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu Rev Biochem* 64:375-401
- Sly, W.S., 2000. The membrane carbonic anhydrases: from CO₂ transport to tumor markers. In: Chegwidan, W.R., Carter, N.D., Edwards, Y.H. (Eds.), *The membrane carbonic anhydrases: from CO₂ transport to tumor markers. The Carbonic Anhydrases*. Birkhauser Verlag Basel, Switzerland, pp. 96–103.
- Spicer S. S., Sens M. A., Tashian R. E., 1982. *J. Histochem. Cytochem.*, **30**, 863—873.
- So A.K, Espie G.S, Williams E.B, Shively J.M, Heinhorst S, Cannon G.C., 2004. A novel evolutionary lineage of carbonic anhydrase (epsilon class) is a component of the carboxysome shell. *J Bacteriol*, 186(3):623-630.
- Soyler, M Van kedisi eritrositlerinden karbonik anhidraz enziminin (E.C.4.2.1.1) saflastırılması ve karakterizasyonu Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü 2006 yüksek lisans tezi.
- Subash, S., Subramanian, P. 2009. Morin a flavonoid exerts antioxidant potential in chronic hyperammonemic rats: a biochemical and histopathological study. *Mol Cell Biochem*. 327:153-161.
- Supuran C.T, Conroy C.W, Maren T.H., 1997. Is cyanate a carbonic anhydrase substrate?: *Proteins Struct Funct Genet* 27:272–278.
- Supuran C.T, Scozzafava A., 2000. Carbonic anhydrase inhibitors and their therapeutic potential. *Exp Opin Ther Patents* 10:575–600.
- Supuran, C.T., Briganti, F., Tilli, S., Chegwidan, W.R. and Scozzafava, A., 2001 *Bioorg. Med. Chem.* 9, 703.
- Supuran CT, Scozzafava A., 2002. Applications of carbonic anhydrase inhibitors and activators in therapy. *Exp Opin Ther Patents* 12:217–242.

- Supuran CT., 2004. Carbonic anhydrases: Catalytic and inhibition mechanisms, distribution and physiological roles carbonic anhydrase. In: Supuran CT, Scozzafara Conway J, editors. Carbonic anhydrase. Its inhibitors and activators. London: CRC Press; p 1–23.
- Supuran, C. T., 2008. *Nat. Rev. Drug Disc.*, 7, 168.
- Stams, T., Christianson, D.W., 2000. X-ray crystallographic studies of mammalian carbonic anhydrase isozymes. In: Chegwiddden, W.R., Carter, N.D., Edwards, Y.H. (Eds.), X-ray crystallographic studies of mammalian carbonic anhydrase isozymes. The Carbonic Anhydrases: New Horizons. Birkhauser Verlag, Boston. pp. 159–174.
- Tappan, D. V., Jacey, M. J. and Boyden, H. M. *Ann. N.Y.*, 1964. *Acad. Sci*, 121, 589.
- Tashian, R.E., Hewett-Emmett, D., Carter, N.D., Bergenhem, N.C.H., 2000. Carbonic anhydrase (CA)-related proteins (CA-RPs) and transmembrane proteins with CA or CA-RP domains.
- Tashian R. E., Hewett-Emmett D., Venta P. J., 1991. “Diversity and Evolution in the Carbonic Anhydrase Gene Family,” ed. by Botrè F., Gros G., Storey B. T., VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim., pp. 151—161.
- Tripp B.C, Bell C.B, Cruz F, Krebs C, Ferry J.G., 2004. A role for iron in an ancient carbonic anhydrase. *J Biol Chem*, 279(8):6683-6687.
- Turkoglu, E.A., Senturk, M., Supuran, C.T., Ekinci, D. 2017. Carbonic anhydrase inhibitory properties of some uracil derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 32 (1) 74-77.
- Verpoorte, J.A., Mehta, S., and Edsall, J.T., 1967 Esterase activities of human carbonic anhydrase. *J.Biol.Chem.* 242, 4221.
- Waheed, A., Okuyama, T., Heyduk, T., Sly, W.S., 1996. Carbonic anhydrase IV: purification of a secretory form of the recombinant human enzyme and identification of the positions and importance of its disulfide bonds. *Arch Biochem. Biophys.* 333, 432–438.
- Waheed A, Zhu X.L, and Sly S.W., 1991. Membrane-associated Carbonic Anhydrase from Rat Lung Purification, characterization, tissue distribution, and comparison with carbonic Anhydrase IVs of other mammals. Vol. 267, No. 5, Issue of February 15, pp. 3308-331
- Whitney, P.L., Brigggle, T.V., 1982. Membrane-associated carbonic anhydrase purified from bovine lung. *J. Biol. Chem.*, 257, 12056–12059
- Whittington, D.A., Grubb, J.H., Waheed, A., Shah, G.N., Sly, W.S., 2004. Christianson, D.W., Expression, assay, and structure of the extracellular domain of murine carbonic anhydrase XIV: implications for selective inhibition of membrane-associated isozymes. *J. Biol. Chem.*, 279, 7223–7228.
- Xadjay, Y.A. I. 1972. *Farmakol. toksikol.* 7-46.
- Xu Y., Feng L., Jeffrey P.D., Shi Y., Morel F.M., 2008. Structure and metal Exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms. *Nature.*, 452(7183):56-61.
- Zanwar, A. A., Badole, S. L., Shende, P. S., Hegde, M. V., Bodhankar, S. L. 2014. Chapter 21 – Antioxidant Role of Catechin in Health and Disease. *Polyphenols in Human Health and Disease*. 1; 267-271.

- Zimmerman, S. A., Ferry, J. G. & Supuran C. T., 2007. Inhibition of the archaeal β -Class (Cab) and γ -Class (Cam) carbonic anhydrases. *Curr. Top. Med. Chem.*, **7**, 901–908
- Zhenyan, Y., Liping, X., Seunghwan, L. and Rongqing, Z.A., 2006. Novel carbonic anhydrase from the mantle of the pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Comp. Biochem. Physiol. B.*, **143**, 190.
- Zhu, X.L. and Sly, S.W., 1990 Carbonic Anhydrase IV from human lung purification, characterization and comparison with membrane carbonic anhydrase from human kidney. **265**, 15

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Habip Çelik
Doğum Yeri	Diyadin
Tarihi	1992
İletişim bilgileri	habipmeyali@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi	Fen Bilimleri Enstitüsü	Biyokimya	Yüksek Lisans	2017
Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi	Fen Edebiyat Fakültesi	Kimya	Lisans	2014

YAYINLARI

A) SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

A.1.	Arslan, T., Çelik, G., Çelik, H. , Senturk, M., Yaylı, N., Ekinci, D. 2016. Synthesis and Biological Evalution of Novel Bischalcone Derivatives as Carbonic Anhydrase Inhibitors. Archive der Pharmazie. 349 (9) 741-748.
-------------	--

B) Uluslar Arası Konferans / sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

B.1.	Cavusoglu, K., Çelik, H. , Senturk, M., Ekinci, D. Investigation of Inhibitory Effects of Some Sulfonamides on Acethylcholinesterase Enzyme. 42st National Physiology Congress. ACTA PHYSIOLOGICA, 2016, Volume: 218, Special Issue: SI Supplement: PC084, Pages: 57.
B.2.	Orhan, M., Çelik, H. , Senturk, E., Javed, K., Durdagi, S., Ekinci, D., Senturk, M. Purification of Carbonic Anhydrase Enzyme from Bovine Liver and Investigation of Inhibition Effects of Some Sulfonamide Derivatives. 3rd International BAU Drug Design Congress, 1-3 October 2015. Istanbul, Turkey.
B.3.	Koz, G., Orhan, M., Çelik, H. , Durdagi, S., Ekinci, D., Şentürk, M., Coşgun, N. Kinetic and Docking Study of Some Malononitrile Derivatives of Acetylcholinesterase. 3rd International BAU Drug Design Congress, 1-3 October 2015. Istanbul, Turkey.
B.4.	Çelik, H. , Kılıç, D., Şentürk, E., Javed, K., Şentürk, M., Küfrevioğlu, Ö.İ. Comparison of Inhibition Effects of Some Sulfonamides on Carbonic Anhydrase Isoenzymes. Trans

	Mediterranean Colloquium on Heterocyclic Chemistry, TRAMECH VIII, 11-15 November 2015, Antalya, Turkey.
B.5.	Çelik, H. , Orhan, M., Şentürk, E., Şentürk, M. Comparison of Inhibition Effects of Some Phenolic Compounds on Carbonic Anhydrase Isoenzymes from Mammalian Tissues. 2 nd IVEK International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies. November 27-29, 2015. Istanbul, Turkey.
B.6.	Bayram, N., Çelik, H. , Turkoglu, E. A., Efe, A., Senturk, M. Inhibitory properties of some analgesic drugs on acetylcholinesterase. 3 rd IVEK International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies. April 26-29, 2017. Istanbul, Turkey.

C) Ulusal Konferans / sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

C.1.	Çelik, H. , Şentürk, M., 2015. Bazı Sülfonamidlerin Sığır Böbrek Karbonik Anhidraz ve İnsan Karbonik Anhidraz I ve II Enzimleri Üzerinde <i>İn Vitro</i> Etkilerinin İncelenmesi. 2. Ulusal hesaplamalı kimya kongresi. 2-5 Haziran, Kars.
C.2.	Çelik, H. , Orhan, M., Arslan, M., Fidan, İ., Şentürk, M., 2015. Asetilkolin Esteraz Enzimi Üzerinde Bazı Hidroksilli Moleküllerin <i>İn Vitro</i> Etkilerinin Belirlenmesi. 2. Ulusal hesaplamalı kimya kongresi. 2-5 Haziran, Kars.
C.3.	Tosun, G., Orhan, M., Çelik, H. , Salmas, R.E., Mestanoğlu, M., Durdağı, S., Ekinci, D., Arslan, T., Şentürk, M., Yaylı, N., 2015. Bazı Pirazol Türevlerinin İnsan Karbonik Anhidraz I ve II İzoenzimleri Üzerinde <i>İn Vitro</i> ve <i>İn Silico</i> Etkilerinin İncelenmesi. 2. Ulusal hesaplamalı kimya kongresi. 2-5 Haziran, Kars.
C.4.	Orhan, M., Çelik, H. , Oğur, E., Şentürk, M., 2015. Safranin Maddesinin Asetilkolin Esteraz Enzimi Üzerinde İnhibisyon Etkisinin İncelenmesi. 2. Ulusal hesaplamalı kimya kongresi. 2-5 Haziran, Kars.
C.5.	Orhan, M., Çelik, H. , Oğur, E., Durdağı, S., Şentürk, M., 2015. Asetilkolin Esteraz ve Butirilkolin Esteraz Enzimleri Üzerinde Anizol Türevlerinin <i>İn Vitro</i> ve <i>İn Silico</i> Etkisilerinin İncelenmesi. 2. Ulusal hesaplamalı kimya kongresi. 2-5 Haziran, Kars.
C.6.	Çelik, H. , Orhan, M., Oğur, E., Talaz, O., Şentürk, M., 2015. asetilkolin esteraz ve butirilkolin esteraz enzimleri üzerinde bazı sülfonamidlerin <i>in vitro</i> etkilerinin incelenmesi. 27. Ulusal kimya kongresi. 23-28 Ağustos, Çanakkale.
C.7.	Çelik, H. , Şentürk, M., 2015. siğir böbrek karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve bazı anyonların <i>in vitro</i> inhibisyon etkilerinin incelenmesi. 27. Ulusal kimya kongresi. 23-28 Ağustos, Çanakkale.
C.8.	Orhan, M., Çelik, H. , Güney, M., Çavdar, H., Şentürk, M., 2015. bazı urasil türevlerinin antioksidan etkilerinin ve bazı antioksidan enzimler üzerine inhibisyon etkilerinin incelenmesi. 27. Ulusal kimya kongresi. 23-28 Ağustos, Çanakkale.