

Nigella sativa (ÇÖREK OTU)'nın
KARBONİK ANHİDRAZ ENZİM AKTİVİTESİ
ÜZERİNDE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI
Elif BOZKURT
Yüksek Lisans
Kimya Anabilim Dalı
Nisan-2012

Nigella sativa (ÇÖREK OTU)'nın KARBONİK ANHİDRAZ ENZİM AKTİVİTESİ
ÜZERİNDE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Elif BOZKURT

Dumlupınar Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği Uyarınca
Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Metin BÜLBÜL

Nisan – 2012

KABUL VE ONAY SAYFASI

Elif BOZKURT'un Yüksek Lisans tezi olarak hazırladığı *Nigella sativa* (çörek otu)'nın karbonik anhidraz enzim aktivitesi üzerinde etkisinin araştırılması" başlıklı bu çalışma, jürimizce Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

/ /2012

Üye Doç. Dr. Metin BÜLBÜL

Üye Doç. Dr. Serap DOĞAN

Üye Yrd. Doç. Dr. Nurgün BÜYÜKKIDAN

Fen Bilimleri Enstitüsünün Yönetim Kurulu'nun ... / ... / 2012 gün ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasan GÖÇMEZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

***Nigella sativa* (ÇÖREK OTU)'nın KARBONİK ANHİDRAZ ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNDE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Elif BOZKURT

Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2012

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Metin BÜLBÜL

ÖZET

Nigella sativa, çörek otu olarak bilinen bir bitkidir. Bu bitki, Akdeniz bölgesinde ve Hindistan, Pakistan ve Afganistan'da dahil olmak üzere Batı Asya ülkelerinde yetişen bir baharattır. *Nigella sativa* tohumları, günümüzde astım ve diğer akciğer rahatsızlıkları, sindirim bozuklukları (örneğin; hazımsızlık, ishal) ve hiperlipidemi tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca antioksidan etkileri ve bağışıklık düzenleyici özellikleri vardır..

Karbonik anhidraz (E.C. 4. 2. 1. 1), merkezinde Zn^{+2} bulunan bir metaloenzimdir. Omurgalılarda CO_2 , bu enzimin substratıdır. Hücreler ve hücreler arası sıvıda CO_2 ve H_2CO_3 dönüşümlerini katalizleyen bir enzimdir.

Bu çalışmada *Nigella sativa*'nın, karbonik anhidraz enzimi üzerinde inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla önce insan eritrositlerinden karbonik anhidraz izoenzimleri (HCA-I, HCA-II) afinite kromatografisi ile ayrı ayrı saflaştırıldı. Daha sonra *Nigella sativa* (çörek otu) homojenatları hazırlandı. Değişik konsantrasyonlardaki homojenatlar ile *Nigella sativa*'nın insan eritrosit CA enzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi incelendi. Çalışmalarda karbonik anhidraz aktivitesinin belirlenmesinde hidrataz ve esteraz aktivitelerinden faydalanıldı. HCA-I'in esteraz aktivitesi üzerinde çalışılan tüm konsantrasyonlarda inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. İnhibisyon etkisi gösteren homojenatlar için % aktivite-[I] grafikleri çizilerek IC_{50} değerleri bulunmuştur. HCA-I esteraz aktivitesine göre inhibisyon gösteren tüm konsantrasyonların IC_{50} değerleri (enzimli reaksiyon süresini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu); $0,2101 \cdot 10^4 \mu M$ - $0,0492 \cdot 10^4 \mu M$ arasında bulunmuştur. %0,1, %0,2, %0,3'lük konsantrasyonlardaki *Nigella sativa* homojenatlarının HCA-I üzerindeki inhibisyon etkisi incelendiğinde K_i değerleri; $4,290 \cdot 10^2 \mu M$ - $3,980 \cdot 10^2 \mu M$ arasındadır. Ayrıca çalışılan tüm konsantrasyonlarında, hidrataz aktivitesi üzerine yapılan çalışmalarda aktivite görülmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Karbonik Anhidraz, İnhibisyon, Afinite Kromatografisi, IC_{50} Değerleri.

AN INVESTIGATION OF THE EFFECT OF *Nigella sativa* ON THE ENZYME CARBONIC ANHYDRASE

Elif BOZKURT

Chemistry, M.S. Thesis, 2012

Thesis Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

SUMMARY

Nigella sativa, a plant known as nigella. In general this type of plant used as a spice. This, in the Mediterranean region and India, including Pakistan and Afghanistan is a spice that grows in the West Asian countries. *Nigella sativa* seeds, today, asthma and other lung diseases, gastrointestinal disorders (eg; indigestion, diarrhea), and is used in the treatment of hyperlipidemia. Also known for antioxidant effects and immune regulatory activity.

Carbonic anhydrase (E.C. 4.2.1.1.), the center of a metalloenzyme with $Zn^{+2}.CO_2$ in vertebrates, is a substrate for this enzyme. Cells and between cells is an enzyme that catalyzes the transformation of liquid CO_2 and H_2CO_3 .

In this study, *Nigella sativa*, was investigated inhibitory effects on the enzyme carbonic anhydrase. For that purpose, human erythrocyte carbonic anhydrase isozymes (HCA-I and HCA-II) were purified separately by affinity chromatography. Later, *Nigella sativa* (black seed) homogenates prepared. Homogenates of human erythrocyte CA enzymes with different concentrations on the inhibitory effect of *Nigella sativa* were investigated. Hydratase and esterase activities of the studies utilized for determining the activity of carbonic anhydrase. *Nigella sativa* certain concentrations (0.25% to 0.5%, 0.1%, 0.2%, 0.3%) of human erythrocytes was determined that the inhibitory effect of CA hydratase and esterase activity. % Activity-[I] for the inhibition effect homogenates IC_{50} values were plotted graphs. HCA-I shows the inhibition of esterase activity of all concentrations IC_{50} values (concentration of inhibitor that reduces by half the duration of enzymatic reaction), $0,2101.10^4 \mu M$ - $0,0492.10^4 \mu M$ was found between. 0.1%, 0.2%, 0.3% HCA-I concentrations on the inhibitory effect of *Nigella sativa* homogenates K_i values were examined; $4,290.10^2 \mu M$ - $3,980.10^2 \mu M$ are among the. In addition, all the concentrations studied, the studies on the activity of hydratase activity was observed.

Key Words: Carbonic Anhydrase, Inhibition, Affinity Chromatography, IC_{50} Values.

TEŞEKKÜR

Tez çalıŐmalarım sırasında bana bu çalışma olanağını sağlayan Kimya Bۆlüm BaŐkanı Sayın Prof. Dr. Yunus ERDOĐAN'a, bu tez çalıŐmasının planlanması ve yürütölmesi süresince bana yardımcı olan danışman hocam Doç. Dr. Metin BÜLBÜL'e, çalıŐmalarımda yardımını esirgemeyen ArŐ. Gör. Ekrem TUNCA'ya ve elektroforez işleminde bizden desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Azmi Yerlikaya' ya teŐekkürü bir borç bilirim.

Tez çalıŐmalarım sırasında benden yardımlarını esirgemeyen Kimya Bۆlümünün değerli öğretim elemanlarına ve yüksek lisans arkadaşlarıma teŐekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca benden maddi manevi desteklerini esirgemeyen değerli aileme saygı ve sevgilerimi sunarım.

Elif BOZKURT

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Nigella sativa</i> (Çörek Otu).....	1
1.1.1. <i>Nigella sativa</i> (çörek otu)'nın içinde bulunan değerli bileşenler.....	2
1.1.2. <i>Nigella sativa</i> (çörek otu)'nın antioksidan özellikleri	3
1.1.3. <i>Nigella sativa</i> (çörek otu)'nın antioksidan özellikleri	4
1.1.4. <i>Nigella sativa</i> (çörek otu)'nın diyabet (şeker hastalığı) üzerindeki etkisi.....	4
2. ENZİMLER	5
3. KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ	10
3.1. Enzim Özellikleri ve Fizyolojik Önemi	10
3.2. CA Enziminin Fizyolojik Fonksiyonları.....	11
3.3. Karbonik Anhidraz Enziminin Üç Boyutlu Yapısı.....	12
3.4. Karbonik Anhidraz (CA) Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar	13
3.5. Fiziksel, Kimyasal ve Kinetik Özellikleri.....	14
3.6. Karbonik Anhidraz Aktivitesi	15
3.7. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri	16
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
4.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	17
4.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar	17
4.3. Biyokimyasal Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....	17
4.4. Yöntemler	19

İÇİNDEKİLER (Devamı)

	<u>Sayfa</u>
4.4.1. Protein tayini	19
4.4.1.1. Kalitatif protein tayini	19
4.4.1.2. Bradford (coomasie blue) yöntemi ile ilgili protein tayini.....	19
4.4.2. Karbonik anhidraz aktivitesi tayini	20
4.4.2.1. CO ₂ - Hidrataz aktivitesi tayini	20
4.4.2.2. Esteraz aktivitesi tayini	20
4.4.3. Afinite jelinin hazırlanması	21
4.4.3.1. Sepharose-4B matriksi üzerinde afinite jelinin hazırlanışı	21
4.4.3.2. Sepharose-4B'nin aktifleştirilmesi ve tirozin takılması.....	21
4.4.3.3. Sülfanilamid kenetlendirilmesi	22
4.4.4. İnsan eritrositlerinden karbonik anhidraz enzimlerinin saflaştırılması	24
4.4.4.1. Hemolizat eldesi.....	24
4.4.4.2. Hemolizatın afinite kolonuna tatbiki ve enzimin elüsyonu.....	24
4.4.4.3. Diyaliz işlemi	24
5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	26
5.1. <i>Nigella sativa</i> (çörek otu)'nın Karbonik Anhidraz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması	29
5.1.1. <i>Nigella sativa</i> (çörek otu)'nın karbonik anhidraz enziminin hidrataz aktiviteleri üzerindeki etkisinin araştırılması.....	29
5.1.2. <i>Nigella sativa</i> (çörek otu)'nın Karbonik Anhidraz Enziminin Esteraz Aktiviteleri Üzerindeki Etkisinin Araştırılması	30
5.1.3. <i>Nigella sativa</i> 'nın İnsan Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Esteraz Aktivitesi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması Çalışmalarından Ki Sabitlerinin Bulunması	36
6. SONUÇ VE TARTIŞMA	38
KAYNAKLAR DİZİNİ	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. (A) <i>Nigella sativa</i> bitki ve morfolojik özellikleri, (B) Thymoquinone (TQ) içeren siyah çörek otu tohumu.	2
1.2. Thymoquinone'nun üç boyutlu yapısı.....	3
2.1. Saflaştırılmak istenen enzimin liganda bağlanması ve elüsyonu	9
2.2. Ligand ile matriks arasında uzantı kolunun şematik gösterimi	9
3.1. İnsan CA-II'nin 3 boyutlu yapısının şematik gösterimi.....	13
4.1. Afinite jelinin hazırlanması	23
4.2. Diyaliz işleminin uygulanması, a)diyaliz torbasının hazırlanması, b) enzim çözeltisinin konulması, c)diyalize bırakılma.....	25
5.1. Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi fotoğrafı (1.kanal- HCA-I Standart, 2.kanal- HCA-I numune, 3.kanal-HCA-II Standart, 4.kanal-HCA-II numune)	28
5.2. Ölçülen absorpsiyon değerlerine karşılık gelen µg protein miktarları	29
5.3. HCA-I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine %0,25 <i>Nigella sativa</i> homojenatının etkisi	30
5.4. HCA-I enziminin esteraz aktivitesi üzerine %0,25'lik <i>Nigella sativa</i> homojenatının etkisi	31
5.5. HCA-II enziminin esteraz aktivitesi üzerine %0,25'lik <i>Nigella sativa</i> homojenatının etkisi	31
5.6. HCA-I enziminin esteraz aktivitesi üzerine %0,5'lik <i>Nigella sativa</i> homojenatının etkisi	32
5.7. HCA-II enziminin esteraz aktivitesi üzerine %0,5'lik <i>Nigella sativa</i> homojenatının etkisi	32
5.8. HCA-I enziminin esteraz aktivitesi üzerine %1'lik <i>Nigella sativa</i> homojenatının etkisi	33
5.9. HCA-II enziminin esteraz aktivitesi üzerine %1'lik <i>Nigella sativa</i> homojenatının etkisi	33
5.10. HCA-I enziminin esteraz aktivitesi üzerine %2'lik <i>Nigella sativa</i> homojenatının etkisi	34
5.11. HCA-II enziminin esteraz aktivitesi üzerine %2'lik <i>Nigella sativa</i> homojenatının etkisi	34
5.12. HCA-I enziminin esteraz aktivitesi üzerine %3'lük <i>Nigella sativa</i> homojenatının etkisi	35
5.13. HCA-II enziminin esteraz aktivitesi üzerine %3'lük <i>Nigella sativa</i> homojenatının etkisi	35
5.14. HCA-I enzimi üzerinde %1 konsantrasyonundaki <i>Nigella sativa</i> homojenatının Lineweaver-Burk grafiği	36
5.15. HCA-I enzimi üzerinde %2 konsantrasyonundaki <i>Nigella sativa</i> homojenatının Lineweaver-Burk grafiği	37
5.16. HCA-I enzimi üzerinde %3 konsantrasyonundaki <i>Nigella sativa</i> homojenatının Lineweaver-Burk grafiği	37

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. CA-II izoenziminin memelilerde doku dağılımı ve işlevi.....	12
3.1. Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri	14
6.1. <i>Nigella sativa</i> (çörek otu) % 0,25, % 0,5, % 0,1, % 0,2, % 0,2 ve % 0,3 konsantrasyonlarındaki homojenatlarının IC ₅₀ değerleri.	39
6.2. <i>Nigella sativa</i> (çörek otu)'nın % 1, % 2, % 3'lük homojenat konsantrasyonlarındaki Ki değerleri.....	40

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**Simgeler**

L	Litre
mL	Mililitre
μ L	Mikrolitre
μ g	Mikrogram
μ M	Mikromolar
nm	Nanomolar

Açıklama**Kısaltmalar**

CA	Karbonik anhidraz enzimi
CARP	Protein bağlı karbonik anhidraz
EC	Enzim kod numarası
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
EI	Enzim-inhibitör kompleksi
ES	Enzim-substrat kompleksi
ESI	Enzim-substrat-inhibitör kompleksi
EU	Enzim ünitesi
HCA-I	İnsan karbonik anhidraz I izoenzimi
HCA-II	İnsan karbonik anhidraz II izoenzimi
I	İnhibitör
IOP	Göz içi basıncı (Intiraocular Pressure)
Tris	Trihidroksimetilaminometan

Açıklama

1. GİRİŞ

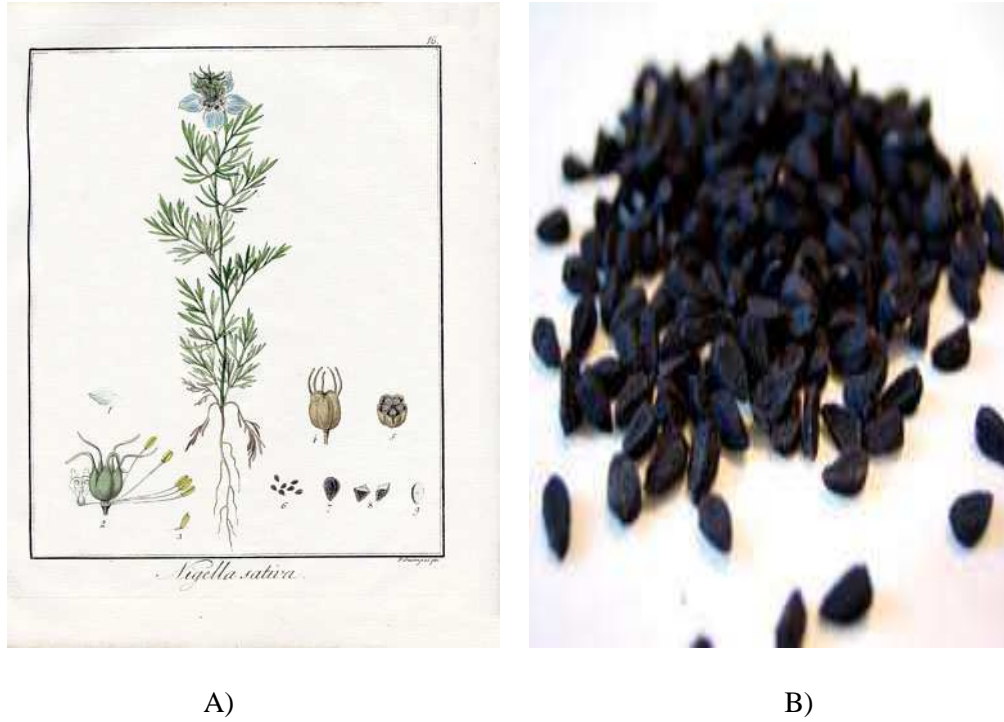
Nigella sativa tohumları (çörek otu) baş ağrısı, öksürük, karın ağrısı, ishal, astım, romatizma ve diğer hastalıkları tedavi etmek için birçok Asya, Ortadoğu ve Uzakdoğu ülkeleri tarafından geleneksel tıpta kullanılmaktadır. Ayrıca antioksidan, anti-inflamatuar, antikanser, analjezik ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Thymoquinone, *Nigella sativa* tohumunun içinde bulunan en önemli bileşiklerdendir (Gali-Muhtasib ve ark., 2006).

Bu madde ile ilgili yapılan çalışmalarda, çörek otunun etken maddesi olan Thymoquinone'un enerji metabolizması üzerine etkisi araştırılmış ve çalışmanın sonucunda 4 haftalık Thymoquinone tedavisi sonrasında kan şekeri, kolesterol ve trigliserid düzeylerinin önemli derecede düştüğü, insülin düzeyinin de yükseldiği tespit edilmiştir. Ayrıca, kan hücrelerinde enerji metabolizması ile ilgili enzimlerin aktivitesini arttırdığı görülmüştür (Fararh ve ark., 2009).

1.1 *Nigella sativa* (Çörek Otu)

Nigella sativa, çörek otu olarak bilinen bir bitkidir. Lakin farklı ülkelerde birçok ismi almıştır. Örneğin, eski Latince de 'Her derde deva' anlamında, Arapça da 'Habbah Sevde' veya 'Habbat El Baraka', 'bereket tohumları' olarak adlandırılır. Çin'de ise 'Hak Jung Chou' yani 'hepsi tedavi' olarak anılır. Hindistan'da ise Kalonji denir. Bitki çiçekli bitkilerin, *Ranunculaceae* ailesine ait olup (Şekil 1A) yaklaşık 14 türü vardır. Bunlardan bazıları sırasıyla, *Nigella arvensis*, *Nigella ciliaris*, *Nigella hareli*, *Nigella hispanica*, *Nigella integrifolia*, *Nigella nigellastrum*, *Nigella orientalis* ve *Nigella sativa*. Bunlar arasında, *Nigella sativa* üzerinde tedavi amaçlı incelemeler günümüzde çokca yapılmıştır ve yapılmaktadır (Aggarwal ve ark., 2008).

Çiçekleri 5-10 yapraklı olup, renkleri; beyaz, sarı, pembe, uçuk mavi ya da soluk mordur. Meyve birkaç birleşik kapsüllerden oluşur, türleri vardır (örneğin; çok sayıda tohum içeren *Nigella Damascena*), kapsüller büyük ve şişirilmiş görünümlüdür. En sık "Alternatif Tıp" da tedavi amaçlı kullanılan bitki parçaları sistemleri tohumlarıdır (Şekil 1B).



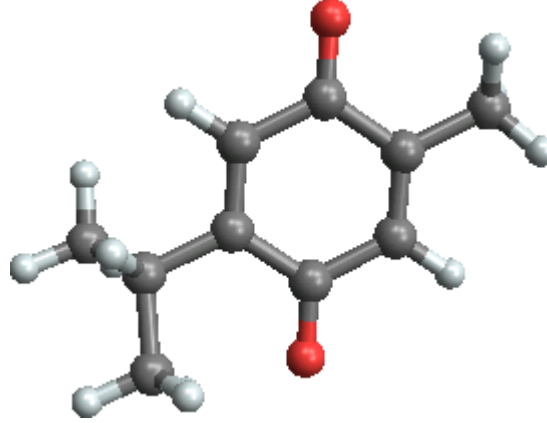
Şekil 1.1 A) *Nigella ariva* bitkisi ve morfolojik özellikleri, B) Thymoquinone (TQ) içeren siyah çörek otu tohumu.

Yağı, keskin ve acı bir tadı olan önemli miktarda birleşik içerir. Köklerinde şişirilmiş bir kapsül bulunur. Genellikle tohumları baharat ve gıda katkı maddesi olarak kullanılır. Halk arasında, gıda ile yutarak veya bal ile karıştırılarak vücuda alınır. Genellikle, lactogogues, carminative ve antihelmthic ajanları olarak kullanılmaktadır. Tohumlarında diüretikler, anti-hipertansif, kas gevşetici ve bağışıklık sistemi zayıf kişilerde bağışıklık artırıcılar olarak kullanılır (DerMarderosian ve ark., 2005). Tohum yağının, topikal dermatit tedavisi için kullanılabileceği rapor edilmiştir (Zedlitz ve ark., 2002).

1.1.1 *Nigella ariva* (çörek otu)'nın içinde bulunan değerli bileşenler

Siyah *Nigella ariva* tohumunun kimyasal bileşiminde; amino asitler, proteinler, karbonhidratlar, sabit ve uçucu yağlar, alkaloidler, saponinler ve pek çok bileşikler vardır. Yağ örneklerinin İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) tarama sonucu dört ana bileşik bulunmuştur. Bunlar, thymoquinone, karvakrol, t-anetol ve saygın radikal süpürücü özelliği gösteren 4-terpineol'dür. Spesifik olmayan hidrojen atomu ya da elektron nakline 2,2'-difenil-p-picrylhydrazyl (DPPH) deneyinde test edildiğinde, bu dört bileşen ve uçucu yağın değişken antioksidan aktiviteye sahip oldukları ortaya çıkmıştır. Yağ örnekleri, değişken antioksidan etki göstermiştir (Abou Basha ve ark., 1995) .

'Kanıtı dayalı bitkisel ilaç' ortak uygulamalar çörek otunun, uçucu yağ biyoaktif bileşeninin thymoquinone olduğunu göstermiştir. Bu bileşiğin üç boyutlu yapısı aşağıda verilmiştir (Şekil 1.2) (Ghosheh ve ark., 1999).



Şekil 1.2 Thymoquinone'nun üç boyutlu yapısı.

1.1.2 *Nigella sativa* (çörek otu)'nın antioksidan özellikleri

Çörek otunun uçucu yağları, olası bir antioksidan aktivite için test edilmiştir. İki TLC tarama yöntemleri kullanarak antioksidanlar için bir değerlendirme yapılmıştır. Thymoquinone ve bileşenleri karvakrol, t-anetol ve 4-terpinol, vücuttaki radikal maddeleri yok edici özellik göstermiştir. Spesifik olmayan hidrojen atomunu ya da aktivite verici elektron için diphenylpicrylhydrazyl deneyde test edildiğinde, bu dört bileşen ve uçucu yağın değişken antioksidan aktiviteye sahip oldukları bulunmuştur (Burits ve Bucar, 2000).

Ayrıca, bazı yağ asitleri içeren *Nigella sativa* (çörek otu)'nın, aktif prensip Ehrlich asit karsinom (EAC), Dalton lymphonia (DLA asit) ve sarkomu-180 (S-180) hücrelerine karşı antitümör aktiviteleri incelenmiştir. *Nigella sativa*'nın, *in vitro* çalışmalarında, bu hastalıkların tümör gelişimini engellediği görülmüştür (Amala, 2002).

1.1.3 *Nigella sativa* (çörek otu)'nın antioksidan özellikleri

Sulu ekstresinin *Nigella sativa* hayvan modellerinde anti-inflamatuar, analjezik ve antipiretik etkinlikleri araştırılmıştır. Özüütün Carrageenan indüklenen pençe ödemi üzerindeki inhibe edici etkisi ve bir anti-enflamatuar etkisi vardır. Ayrıca, analjezik etki gösteren farelerde sıcak plaka reaksiyon süresinde de önemli bir artış olmuştur. Bununla birlikte, *Nigella sativa*'nın ham süspansiyonunun kullanıma bağlı ateş üzerinde hiçbir etkisi yoktur. Bu çalışma, *Nigella sativa*'nın halk hekimliğinde kullanılıyor olması nedeniyle, etki mekanizmasını aydınlatmak için, analjezik ve anti-inflamatuar hususunda derin araştırmalar yapmayı destekler (Box ve Dammam, 2008).

1.1.4 *Nigella sativa*'nın diabet üzerindeki etkisi

Yapılan bir araştırmada, deney fareleri diabet oluşturulduktan sonra çörek otundan elde edilmiş olan thymoquinone maddesi ile 4 hafta süreyle beslenmişler ve bu süre sonunda diabetik farelerin kan şekeri düzeyinin anlamlı derecede düştüğü tespit edilmiştir. Bu olayın mekanizmasına yönelik yapılan deneylerde de; Thymoquinone'un karaciğerde glukoz üretimini azalttığını göstermiştir (Fararh ve ark., 2005).

Yine başka bir çalışmada, diabetik deney hayvanlarında Thymoquinone'un hiperglisemiyi ve hipoinsülinemiyi önlediği tespit edilmiştir. Bu olayın mekanizması araştırılmış ve Thymoquinone'un hücresele düzeyde protein kinaz gibi enzimleri baskılayarak etkisini gösterdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak da Thymoquinone'un diabeti önleyici etkisi özellikle vurgulanmıştır (El-Mahmoudy ve ark., 2005).

Bir diğer çalışmada da çörek otu yağının diabetik farelerde herhangi bir yan etkiye neden olmadan kan şekerini önemli düzeyde düşürdüğü gösterilmiştir (El-Dakhkhny ve Ark., 2002). Başka bir çalışmada ise çörek otunun pankreasdan insülin salgısını arttırarak kan şekeri düzeyini düşürdüğü gösterilmiştir (Rchid ve ark., 2004).

2. ENZİMLER

Enzimler, canlı organizmalarda kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürünün oluşmasına fırsat vermeden spesifik olarak % 100'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç olmak üzere, bütün enzimler protein yapısındadır (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

Enzimler genellikle tek bir kimyasal reaksiyonu veya aynı özellikte reaksiyonları katalizler (Keha ve Küfrevioğlu, 2004). Enzimle katalizlenen reaksiyonlar, katalizlenmeyen reaksiyonlara göre 10^{15} ile 10^{20} kat daha hızlıdır. Tipik olarak, her enzim molekülü saniyede 100 ile 1000 substrat molekülünü ürüne çevirme yeteneğine sahiptir (Champe ve Harvey, 1997).

Enzimle tepkimelere katılan kimyasal maddelere substrat adı verilir. Enzimler substratlara göre daha hacimlidirler. Kataliz olayında enzimin sınırlı bir alanının etkin olduğu düşünülmüş ve bu alana da aktif bölge denilmiştir. Aktif bölgeler çoğu kez, enzimdeki yarıklara veya multienzimlerde alt birimler arasındaki ara kesit yüzeylerine yerleşmiştir (Dikmen ve Özgünen, 2004). Enzim substratına geçici olarak aktif bölgeden bağlanır ve enzim-substrat bileşiği (ES) oluşur. Daha sonra substrat ürüne veya ürünlere dönüşür.

Bazı enzimler aktivite için, protein yapısını oluşturan amino asit kalıntılarından başka kimyasal komponent gerektirmezler. Bazı enzimler ise koenzim (kofaktör) diye adlandırılan bir ek kimyasal komponente ihtiyaç duyarlar (İnan ve Gül, 2001). Koenzim, Fe^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} gibi bir veya daha fazla inorganik iyon ya da organik, metalloorganik kompleks bir molekül olabilir. Koenzimler, suda çözünen bir vitamin alabildiği bir veya daha fazla metal iyonu da gerektirebilirler. Kofaktörü ile birlikte tam, katalitik olarak aktif bir enzim, holoenzim olarak adlandırılır; holoenzimin bir protein kısmı bir de kofaktör kısmı vardır. Holoenzimin protein kısmı apoenzim veya apoprotein olarak adlandırılır. Holoenzimin kofaktör kısmının, bazı enzimler için Fe^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} gibi bir veya daha fazla inorganik iyon; bazı enzimler için ise organik veya metalloorganik kompleks bir moleküldür. Holoenzimin kofaktör kısmı; enzime çok sıkı bağlanmış olabildiği gibi, koenzim enzime çok gevşek olarak bağlanmış olabilir. Koenzimlerin enzim proteinine çok sıkı bir şekilde, kovalent olarak bağlı olup enzim proteininden ayrılmayanları prostetik grup olarak adlandırılırlar (Keha ve Küfrevioğlu, 2004). Koenzimlerin enzim proteinine çok gevşek bir şekilde nonkovalent olarak bağlı olup enzim proteininden ayrılabilenleri kosubstrat olarak adlandırılırlar. Kofaktör olarak metal iyonu kullanan enzimlere metaloenzim denir. Metal iyonları asit-baz katalizi, kovalent kataliz veya enzimin konformasyonunda değişiklik yaparak substratın bağlanmasını kolaylaştırır (İnan ve Gül, 2001).

Enzimlerin reaksiyon hızları bazı faktörler tarafından etkilenmektedir. Bu etkenler sırasıyla;

- Substrat konsantrasyonu
- Enzim konsantrasyonu
- İnhibitör veya aktivatör konsantrasyonu
- Kofaktör konsantrasyonu (varsa)
- pH
- Sıcaklık
- İyonik şiddet

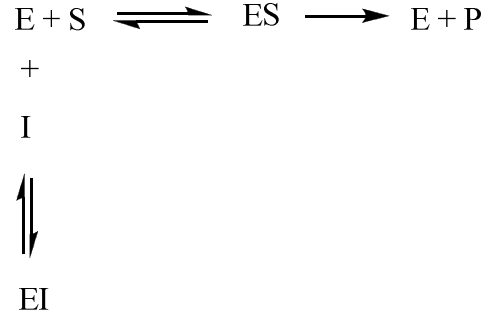
Enzimlerin katalizleme güçleri, turnover sayısı ile ifade edilir. Turnover sayısı, birim zamanda bir mol enzimin ürüne dönüştürdüğü substratın mol sayısıdır. Turnover sayısı en yüksek olan enzimlerden biri de karbonik anhidrazdır ($600.000s^{-1}$) (Harper, 1975).

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

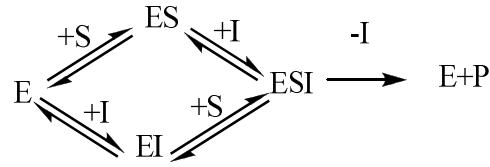
Dönüşümlü inhibisyon dört grupta incelenir;

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

Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi yarışmalı (kompetitif) inhibisyonudur. Yarışmalı inhibitör; yapı 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. Yarışmalı inhibitör belli bir substrat için belirlenmiş K_M 'i (Michaelis sabiti) yükseltir. Yani, yarışmalı bir inhibitör varlığında $1/2V_{max}$ 'a erişmek için daha fazla substrat gerekir (Supuran ve ark., 2000; Sly ve Hu, 1995). Yarışmalı inhibisyon aşağıdaki gibi gösterilebilir.

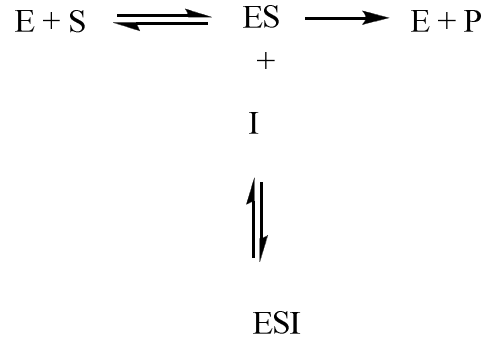


Dönüşümlü bir tip olan yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonda inhibitör ve substrat, enzim moleküllerine aynı anda bağlanabilir. Dolayısıyla bağlanma enzimin aynı bölgesinde değildir. Yarışmasız bir inhibitör etkisini, enzimin turnover sayısını, yani katalitik aktivitesini düşürerek gösterir. Burada substrat ve inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir. Substrat konsantrasyonunu artırmakla inhibisyon kaldırılmaz. Enzimin V_{max} değeri azalırken, K_M sabit kalır. Substrat ve inhibitör farklı bölgelere bağlanabildiğinden, enzimin iki farklı inaktif kompleksi meydana gelir: EI (enzim inhibitör) ve ESI (enzim substrat ve inhibitör) (Keha ve Küfrevioğlu, 2004). Yarışmasız inhibisyon aşağıdaki gibi gösterilebilir.



Diğer dönüşümlü inhibisyon tipi, yarı yarışmalı (unkompetitif) inhibisyondur. Bu inhibisyon çeşidinde, inhibitör serbest enzime bağlanamaz, ES kompleksine bağlanır. Birden fazla substratlı enzimlerde bu inhibisyon tipine daha sık rastlanır. Yarı yarışmalı inhibitör varlığında substrat konsantrasyonunun yükseltilmesi ile inhibisyon artabilir. Yarı yarışmalı inhibitör varlığında V_{max} ve K_M değeri azalır (Gilbert, 1992; Telefoncu, 1986).

Yarı yarışmalı inhibisyon aşağıdaki gibi gösterilebilir.



Lineer karışık tip inhibisyon türü yarışmasız inhibisyonun özel bir tipidir. Bu inhibisyon substratın EI kompleksine bağlanabildiği zaman gerçekleşir. Her iki durumda da inaktif ESI kompleksi oluşur.

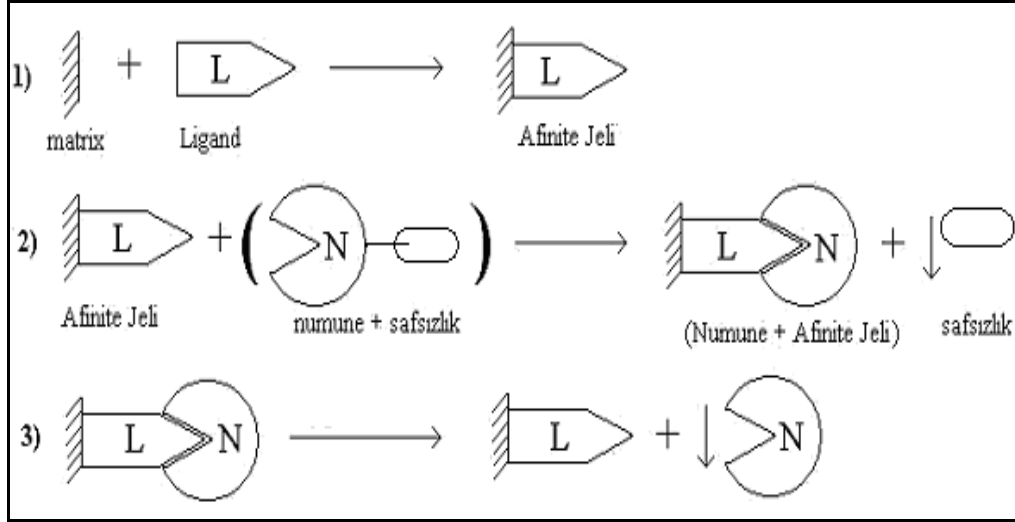
Enzim inhibisyonu gibi konuları ele alan çalışmalarda enzim saflığı çok önemlidir. Enzim saflaştırılmasının amacı, özgül bir enzimi diğer birçok yapı taşıyı içeren ham bir hücre özütünden ayırmaktır (Dikmen ve Özgüven, 2004). Bir enzimin saf bir şekilde hücreden veya dokudan izolasyonu oldukça zordur. Buna rağmen birçok enzim saf olarak elde edilmiştir. Çok sayıda enzim kısmen saflaştırılmış ve 200'den fazlası ise kristal olarak elde edilmiştir. Proteinlerden globüler proteinler suda ve sulu tuz çözeltilerinde çözünürler bu özelliklerinden yararlanarak saflaştırma işlemleri yapılmaktadır.

Globüler proteinlerin saflaştırma işleminde yararlandığımız özellikleri ise şunlardır:

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

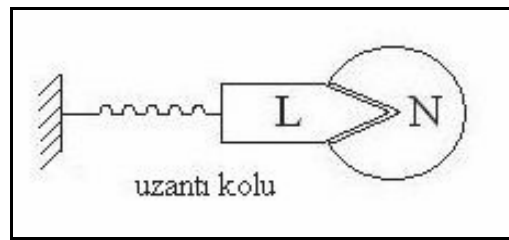
Karbonik anhidraz enzimi için, bu saflaştırma yöntemlerinden en uygun, en doğru sonucu vereni afinite kromatografisi (spesifik ligandları esasına dayanılarak proteinlerin ayrılma yöntemi) yöntemidir ve bu yöntemle karbonik anhidraz enzimini saflaştırılarak karakterizasyon incelenmesi yapılabilmektedir. Bu yöntemde; ligand, enzime çok spesifik olduğundan enzime kolayca bağlanır. Safsızlıklar ise kolon materyaline tutunamadıklarından kolonun akış yönünde ilerleyerek uzaklaşırlar ve enzim kolonda kalır. Kolonda kalan enzim, uygun tamponlarla elue edilir (Dikmen ve Özgüven, 2004).

Afinite kromatografisi aşağıdaki gibi şematize edilebilir. Burada basamak basamak afinite jeli oluşumu, numunenin jele tutunması ve istenilen enzimin saf bir şekilde elüsyonu gösterilmiştir. (Şekil 2.1.)



Şekil 2.1 Saflaştırılmak istenen enzimin liganda bağlanması ve elüsyonu.

Saflaştırılması istenen molekülün kolondaki liganda bağlanması, çoğu durumda matriks ile ilgili molekül arasındaki sterik engelden dolayı zorlaşmakta ve kolon verimi düşmektedir. Bu problem, uygun uzantı kolu kullanılarak ortadan kaldırılabilir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Ligand ile matriks arasında uzantı kolunun şematik gösterimi.

Enzimler için spesifik aktivite hesaplanmalıdır. Spesifik aktivite (özellik aktivite) terimi; 1mg proteine karşılık gelen enzim ünitesi (E.U/ mg protein) olarak ifade edilir. Bu değer enzim saflığının bir ölçüsüdür ve enzim saflaştırılması esnasındaki basamaklarda maksimum ve sabit bir değere ulaşır. Böylece enzimin saf halde elde edildiği tespit edilir (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

3. KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ

3.1 Enzim Özellikleri ve Fizyolojik Önemi

Karbonik anhidraz (karbonat hidrolizaz, E.C. 4.2.1.1) çinko içeren ve karbondioksitin tersinir hidrasyonunu katalize eden bir enzimdir (Lindskog, 1997). Katalizlenen reaksiyon aşağıda verilmiştir.



Fakat H_2CO_3 kendiliğinden



şeklinde iyonlarına ayrışır.

Yapılan çalışmalarda; yukarıdaki hidrasyon ve dehidrasyon reaksiyonlarının kendiliğinden oluşum hızından çok daha hızlı olduğu görülmüştür (Slyke ve Hawkins, 1930) Birkaç yıl sonra karbonik anhidraz varlığı başka canlılarda ve başka dokularda da ortaya çıkarıldı (Daveport ve Wilhelmi, 1941; Common, 1941).

Balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında ve yumurta kabuğunun oluşumunda, alglerde ve bitki kloroplastlarında bu enzimin önemli rolleri belirlenmiştir. CA, sözü geçen canlı hücrelerin çoğunda; stoplazmada çözünmüş, bazende hücre membranına zayıfça bağlanmış olarak bulunmaktadır (Pocker ve Sarkanen, 1979).

Bir canlı türünde aynı reaksiyonu katalizleyen ve farklı kimyasal yapıya sahip enzimlere izoenzim adı verilir. Izoenzimlerin aktiviteleri farklı; substrat, kofaktör ve inhibitörlere afiniteleri değişik olabilir (Keha ve Küfrevioğlu, 2004). Izoenzimlerin başlıca özellikleri arasında aminoasit sayı ve sırasının farklı olması, herbir alt ünitenin ayrı geninin olması ve elektroforetik hareketliliklerinin farklı olması sayılabilir.

İzoenzimlere örnek karbonik anhidraz (CA) verilebilir. CA'nın birçok canlı türünde CO_2 'in hidrasyonu ve bikarbonatın dehidrasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen çok sayıda izoenzimi vardır. Bugüne kadar memeli hayvanlar için; eritrositlerde (CA-I ve CA-II), iskelet kasında (CA-III), insan böbreğinde (CA-IV), belirli dokuların mitokondrilerinde (CA-V), tükürük bezlerinde (CA-VI) ve sitozolde (CA-VII) karbonik anhidraz izoenzimleri belirlenmiştir. Genelde tek polipeptid yapıya sahip olan bu izoenzimlerin yanında bitkilerde oligomerik yapıda CA izoenzimlerine rastlanmıştır (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).

İnsanları da içine alan yüksek yapılı omurgalıların farklı doku ve hücrelerine yerleşmiş, 16 farklı CA izoenzimi tespit edilmiştir (Keha ve Küfrevioğlu, 2004). Bu izoenzimlerin, katalitik etkinlik ve inhibitör bağlama özelliklerinde bazı önemli farklar bulunmaktadır (Supuran ve Scozzafova, 2001). Bu izoenzimlerden CA I, II, III ve VII olmak üzere dört tanesi sitozoliktir. CA-IV, CA-IX, CA XII ve CA XIV ise membrana bağlıdır. CA-V mitokondriyal, CA-VI tükürükte salgılanır (Pocker ve Sarkanen, 1979).

3.2 CA Enziminin Fizyolojik Fonksiyonları

Genel olarak insandaki CA izoenzimlerinin incelenmesi sonucunda ortaya çıkarılmıştır. HCA-I ve HCA-II izoenzimleri insan eritrosit hücrelerinde bulunur. Bu izoenzimlerin en önemli fonksiyonu; doku kılcal damarlarında metabolizma ürünü olan CO₂'i H₂CO₃'e, akciğer pulmoner kapilerde ise H₂CO₃'i CO₂'e dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyerek solunum olayında yer almasıdır. HCA-I eksikliği sendromu belirlenmiş olmasına rağmen herhangi bir klinik semptomla ilişkisi bulunamamıştır (Supuran ve Scozzafova, 2001; Sly ve Hu, 1995).

CA-II izoenzimi karbonik anhidrazın üzerinde en çok çalışılan formudur. Bu izoenzimin turnover sayısı 25 °C'de 10⁶ s⁻¹ olarak bulunmuştur. CA-II'nin doku dağılımı geniştir ve pek çok farklı organ ve hücre tipinde bulunur. Osteoporoz, renal tübüler asidoz ve serebral kalsifikasyonla ilişkili olması bu izoenzimin kemikte, böbrekte ve beyindeki önemini gösterir (Lindskog 1997). Çizelge 2.1'de CA-II izoenziminin memelilerde doku dağılımı gösterilmiştir.

HCA-II ve HCA-IV izoenzimleri, göz lensi, kornea ve silyer epitelyumda bulunmaktadır. Glokom hastalığı tedavisi için yapılan araştırmalar sonucunda gözdeki HCA-II izoenziminin önemi anlaşılmıştır.

Glokom hastalığı sonucunda, yüksek göz içi basıncı görülmekte (intraocular pressure, IOP) ve hastalık dönüşümsüz körlüğe neden olmaktadır. IOP'nin tek kontrol noktası göz içi sıvısıdır (humor aköz). Karbonik anhidraz enziminin humor aközün salgılanmasında uyarıcı etkisi vardır. Bu enzimin inhibisyonu ile silyer epitelinin salgı aktivitesi %25–30 oranında azalmaktadır (Supuran ve ark., 2000).

CA-III'ün turnover sayısı 8.10³ s⁻¹'dir. Düşük aktiviteli bir enzimdir. Diğer CA izoenzimlerine göre, sülfonamidlerin inhibisyonuna daha az hassastır. Başlıca çözünür protein olduğu ve CO₂'in doku kılcal damarlarına difüzyonunu kolaylaştırmada rol oynadığı sanılmaktadır. Yavaş kasılan kırmızı kas liflerinde en çok bulunur. Ayrıca, yağ hücrelerinde de bu izoenzimin konsantrasyonu yüksektir. CA-I ve CA-II gibi CA-III'te p-nitrofenil asetat

hidrolizi aktivitesine sahiptir. Öte yandan, CA-III'ün fosfataz aktivitesi gösterildiği bildirilmiştir (Lindskog, 1997).

Çizelge 2.1 CA-II izoenziminin memelilerde doku dağılımı ve işlevi

Doku Dağılımı	İşlevsel Roller
Yemek borusu ve larinks epiteli	Mideden yemek borusu ve daha yukarı bölgelere mide içeriğinin geri akımını engeller
Kemik osteoklast hücreleri	Kemik resorpsiyonu
Göz	Aköz hümanın üretimi
Testis	Sperm hareketliliği
Böbrek	İdrar asidifikasyonu
Beyin	BOS salgısı
Akciğer	Gaz değişimi
Eritrositler	Gaz değişimi
Gastrointestinal epiteli	H ⁺ salgısı, HCO ₃ ⁻ salgısı

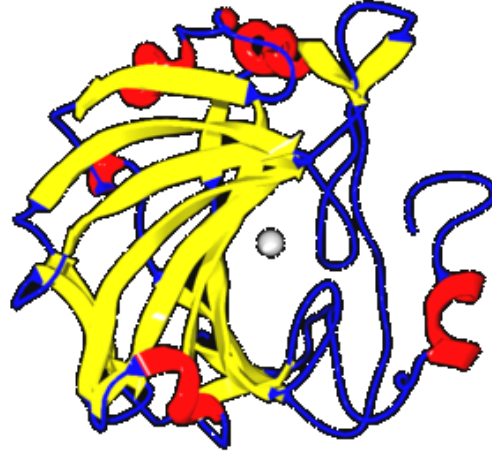
CA-IV ve CA-VI izoenzimleri sinyallerin hedef doku ve organlara ulaşmasını sağlarlar. CA-IV membrana bağlıdır. Akciğerdeki ve bazı diğer organlardaki kılcal damarların endotel hücrelerinin plazma yüzeyinde ve ayrıca böbrek membranına bağlı bulunduğu gibi bazı epitel hücrelerinin membranına bağlı olarak bulunur (Sly ve Hu, 1995).

CA-V, belirli dokuların mitokondrilerinin matrikslerinde bulunur. CA-V'in sırasıyla karbamoil fosfat sentetaz-I'e ve piruvat karboksilaz enzimlerine bikarbonat iyonu sağlayarak ürogenez ve glukoneogenez de rol oynadığı ileri sürülmektedir. CA-V'in lipogenez olayında da rol oynaması mümkündür (Hazen ve ark., 1996).

CA-VI izoenzimi tükürük bezlerinden salgılanan bir enzimdir ve insan tükürüğünden yalıtılmış olup, tükürüğün pH düzenlemesinde rol oynadığı düşünülmektedir. CA-VII izoenzimi ise tükürükteki bikarbonatın salgılanmasında rol oynayabilir (Lakkis ve ark., 1996).

3.3 Karbonik Anhidraz Enziminin Üç Boyutlu Yapısı

CA, varlığı bakımından incelenen bütün hayvanlarda ve fotosentez yapan organizmalarda ve aynı zamanda bazı fotosentetik olmayan bakterilerde bulunan yaygın bir enzimdir. α , β ve γ olarak adlandırılan, evrimsel açıdan ilişkisiz üç CA ailesinin varlığı şaşırtıcı buluşlardan biridir (Hewett-Emmett ve Tashian, 1996). Farklı CA ailelerinin temsilcilerinin arasında kayda değer sekans homolojileri bulunmaz ancak hepsi çinko enzimleridir (Fukuzawa ve ark., 1990; Fukuzawa ve ark., 1990).



Şekil 3.1. İnsan CA-II'nin 3 boyutlu yapısının şematik gösterimi.

İnsan CA-I ve CA-II'nin kristal yapısında, sığır CA-III'ünde, sıçan CA-V'inde ve E.coli'de bulunan CA'lar α -CA yapısındaki enzim tipidir. Bu izoenzim formlarının genel yapıları çok benzerdir. Moleküller neredeyse küresel, yaklaşık boyutları ise $5 \times 4 \times 4 \text{ nm}^3$ 'tür. Molekülün kalan kısmına gevşek şekilde bağlı olan amino terminal bölge haricinde, bu α -CA lar tek etki alanlı proteinler olarak düşünülebilir. On iplikçik ve molekülü iki eş parçaya bölen sarılmış bir β şeridinden oluşan bölge, yapının ikinci bölgesidir. İki paralel iplik çifti haricinde, β şeritleri antiparaleldir. Molekülün yüzeyinde diğerlerine göre daha kısa olan heliksler bulunur (Boriack-Sjodin ve ark., 1995).

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

3.4. Karbonik Anhidraz (CA) Enziminin Katalizlediği Reaksiyonlar

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

Çizelge 3.1 Karbonik anhidraz enziminin katalizlediği reaksiyon türleri.

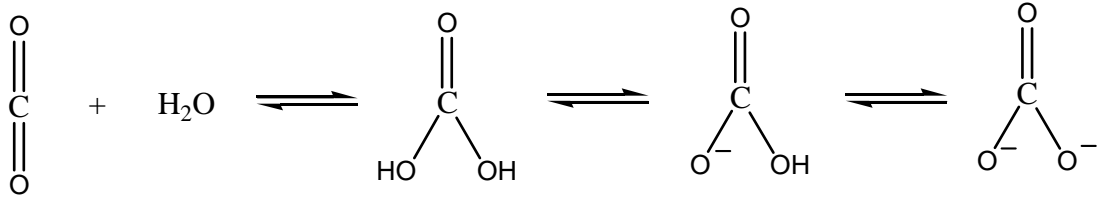
1	O=C=O	+	H ₂ O	↔	HCO ₃ ⁻ + H ⁺
2	HN=C=NH	+	H ₂ O	↔	H ₂ NCONH ₂
3	RCHO	+	H ₂ O	↔	RCH(OH) ₂
4	RCOOAr	+	H ₂ O	↔	RCOOH + ArOH
5	RSO ₃ Ar	+	H ₂ O	↔	RSO ₃ H + ArOH
6	ArPO ₃ ⁻²	+	H ₂ O	↔	HPO ₃ ⁻² + ArOH
7	PhCH ₂ OCOCl	+	H ₂ O	↔	PhCH ₂ OH + CO ₂ + HCl
8	ArF	+	H ₂ O	↔	HF + ArOH
9	RSO ₂ Cl	+	H ₂ O	↔	RSO ₃ H + HCl

Kaynak: Supuran ve Scozzafava, 2001.

3.5 Fiziksel, Kimyasal ve Kinetik Özellikleri

Karbonik anhidraz çok sayıda olumlu özelliğinin yanında çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesi kaybolmadan uzun süre bekletilmesi gibi avantajlı özelliklere de sahiptir (Pocker ve Janjic, 1989).

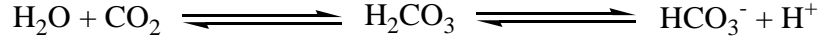
Karbonik anhidraz, CO₂ ve H₂CO₃ veya ortamın pH'sına göre HCO₃⁻ ve CO₃⁻² iyonları arasında dönüşümleri katalizleyen bir enzimdir. Düzlem bir molekül olan CO₂'in farklı açılara sahip piramidal yapıda H₂CO₃'e kendiliğinden dönüşümü oldukça yavaştır.



Karbonik anhidrazın bilinen on altı izoenziminden üçü olan CA I, CA II ve CA III kristallendirilmiş ve yapıları hakkında ayrıntılı bilgiler elde edilmiştir. Üç izoenzime de bakıldığında sitoplazmada çözülmüş halde buldukları, molekül ağırlıklarının 28000 dalton olup 259 veya 260 amino asitten oluşan tek bir polipeptid zinciri oldukları tespit edilmiştir. Her bir enzim molekülünün aktif bölgesi, yaklaşık tetrahedral geometriye sahip, üç histidin imidazol halkası ve bir su molekülü ile koordine olmuş Zn⁺² iyonu içermektedir. Zn⁺² iyonunun kataliz olayındaki fonksiyonu çok önemlidir. Zira uzaklaştırılmasıyla elde edilen apo-CA'lar aktivitelerini kaybederler (Armstrong ve ark., 1966; Scher ve Dietsch, 1984).

3.6 Karbonik Anhidraz Aktivitesi

Karbonik anhidraz enziminin aktivitesi; CO₂'nin hidratasyonu, bikarbonatın dehidratasyonu ve bazı esterleri hidrolizi gibi özelliklerinden yararlanılarak belirlenir.



Yukarıdaki reaksiyonda görüldüğü gibi, koşullara göre CO₂ gazı oluşmakta ya da harcanmaktadır. Aynı zamanda H⁺ konsantrasyonu artmakta veya azalmaktadır. Açığa çıkan veya harcanan CO₂ gazı, metodun reaksiyon pH'sının değişken olması, CO₂'in suda az miktarda çözünmesi ve fazla zaman alması gibi dezavantajları vardır (Stams ve ark., 1988; Briganti ve ark., 1996; Maren ve Conroy, 1993).

Diğer yandan, ortamdaki H⁺ konsantrasyonu; pH'nın yükselmesi veya düşmesi için geçen süre potansiyometrik yolla inhibitörle belirlenebilir. Fakat bu metodun çabuk uygulanması gibi bir avantajının yanı sıra, reaksiyon sırasında pH'nın değişken olması CO₂'in suda çözünmesi ve kullanılan indikatörünün inhibisyon etkisi gibi olumsuz sonuçları da vardır. Bu dezavantajları en az düzeye indirmek için sabit pH'da titrasyon veya 0,02-0,05 birimlik pH düşüşünün indikatörlü ortamda, spektrofotometre ile ölçüm yapıldığı hızlı akış reaksiyonu gibi metotlar aktivite tayininde kullanılmaktadır (Maren ve Conroy, 1993; Landolfi ve ark., 1998).

Enzimin saflaştırma basamağında aktivite ölçümleri, genellikle bütün araştırmacılar tarafından Wilbur-Anderson metodu ile yapılmaktadır. Bu yöntemde; CO₂ hidratasyonunda pH'nın 8,2'den 6,3'e düşmesi için geçen süre, pH-stat metodu kullanılarak bulunmaktadır.

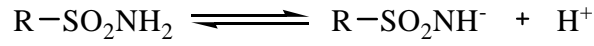
Enzim birimi ise, enzimsiz CO₂-hidratasyon süre (t₀) ile enzimli reaksiyon süresi (t_c) arasındaki farkın, t_c'ye bölünmesi ile belirlenmektedir. Buna göre enzim ünitesi, enzimsiz reaksiyon süresini yarıya düşüren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır (Landolfi ve ark., 1998).

Enzimin esteraz aktivitesi ise, p-nitro fenil asetatın hidrolizi ile açığa çıkan p-nitro fenol miktarının 348 nm'de spektrofotometrik ölçümü ile tayin edilmektedir (Landolfi ve ark., 1998; Verpoorte ve ark., 1967).

3.7 Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

Karbonik anhidraz inhibitörleri iki kısımda incelenmektedir. Bunlardan birincisi metallere kompleks yapmış olan anyonlar, diğer grup ise, proteinsiz çinko ligandı tarafından süstitüe edilerek enzimin Zn (II) iyonuna bağlanmış olan veya genellikle trigonal-bipiramidal yapıda olup metal koordinasyon halkasına katılan inhibitörlerdir.

Yapılan çalışmalarda karbonik anhidraz enziminin en güçlü organik inhibitörünün aromatik ve heteroaromatik sülfonamidler olduğu belirtilmiştir. Sülfonamidlerin kolaylıkla iyonik yapı kazanmaları araştırmacıların ilgisini çeken özelliklerinden biridir. Sülfonamidin ligand olarak kullanıldığı bu iyonik yapının reaksiyonunda;



olarak oluştuğu ve bu özelliğin de karbonik anhidraz enzimi üzerindeki inhibisyon için son derece önemli olduğu bildirilmiştir (Kohn ve Wilchek, 1978).

Sülfonamidler, hidrofilik bölgeye ilaveten, aromatik ve heterosiklik hidrofobik bölgelere sahip olan, süstitüe olmamış bir $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ grubu veya bir $-\text{SO}_2\text{NH}(\text{OH})$ grubu içeren etkin inhibitörlerdir. Sülfonamid grubunun N atomunun anyonlar şeklinde ($\text{R-SO}_2\text{NH}^-$ veya $\text{R-SO}_2\text{N-OH}^-$) ilk bağlandıkları yer CA enziminin aktif bölgesindeki Zn^{+2} iyonudur. İkinci olarak da hidrofobik etkileşmelerle inhibitörün enzime bağlanması tamamlanmış olur. Sülfonidamidlerin, karbonik anhidraz enzimine güçlü bir şekilde bağlanması; bu iki etkinin toplamıdır (Kohn ve Wilchek, 1978).

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan siyanür bromürle aktifleştirilmiş sepharose-4B, p-nitrofenil asetat, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin(TEMED), L-tirozin, trihidroksi metil aminometan (Tris), sodyum sitrat dihidrat, sitrik asit, sodyum klorür, sodyum sülfat, sodyum perklorat, sodyum asetat, sodyum fosfat, hidroklorik asit, fosforik asit, aseton, etanol, sülfürik asit, akrilamid, tiyonil klorür, piridin, N,N' metilen bisakrilamid, coomassie brillant blue G-250 ve R-250 E, sodyum hidroksit ve karbondioksit gazı piyasadan sağlanmıştır.

4.2 Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır. Kullanılan aletler ve cihazlar DPÜ, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümünde bulunmaktadır.

Santrifüj: Nüve NF800

Soğutmalı santrifüj: Sigma K30

Spektrofotometre: UV-1700 Mod. Shimadzu Mar. + AKS

pH metre: Schott Instruments/ Lab850

Peristaltik pompa: Ismatec MS- 4/8 Reglo digital 4 kanallı 8 tekerli

Karıştırıcı: Vortex- Genie, Heidolp

Hassas terazi: Ohaus- Adventurer

Kronometre: Hanhard, Electronische Digital- Stoppuhr Germany

Otomatik Pipetler : Biohit Proline

Magnetik karıştırıcı: Heidolp MR 3001

Çalkalayıcı: GFL

4.3 Biyokimyasal Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Biyokimyasal çalışmalarda kullanılan çözeltilerin kullanılış yerleri ve hazırlanış şekilleri aşağıda belirtilmiştir.

1) Esteraz aktivitesi ölçümü ve diyalizde kullanılan tampon 0,05M Tris-SO₄, pH=7,4: 6,055g (0,05 mol) Tris, 950 mL destile suda çözüldü. 1N H₂SO₄ ile pH=7,4'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim 1 litreye destile su ile tamamlandı.

2) Sepharose- 4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon 0,2 M NaHCO₃, pH=8,8: 16,8 g (0,02 mol) NaHCO₃, 950 mL destile suda çözüldü. 1N NaOH ile pH=8,8'e titre edildikten sonra toplam hacim destile su ile 1 litreye tamamlandı.

3) 0,0025 M Veronal tamponu : 5,15 g sodyum barbitalin 900 mL suda çözülüp, pH= 8,2'ye kadar 0,1 M HCl ile titrasyonundan sonra destile su ile 1 litreye tamamlandı.

4) Afinite jelinin dengelenmesi için kullanılan tampon 25 mM Tris-HCl/ 0,1 M Na₂SO₄, pH= 8,7: 3,0275 g (25 mmol) Tris ve 14,2 g (0,1 mol) Na₂SO₄, 950 mL destile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH=8,7'ye getirildikten sonra destile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.

5) Hemolizatın tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanmasında kullanılan tampon 25 mM Tris-HCl / 22 mM Na₂SO₄, pH=8,7: 3,0275 g (25 mmol) Tris ve 3,124 g (22 mmol) Na₂SO₄, 950 mL destile suda çözülüp, 1N HCl ile pH= 8,7'ye getirildikten sonra hacim 1 litreye destile su ile tamamlandı.

6) Kolona tutunmuş HCA-I izoenzimi ve HCA-II izoenziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti: 0,1 M NaCH₃COO⁻/ 0,5 M NaClO₄, pH= 5,6: 9,187 g 0,075 mol NaClO₄ ve 2,09 g (0,15 mol) NaCH₃COO.H₂O, 120 mL destile su ile çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 5,6'ya getirildikten sonra, hacim destile su ile 150 mL'ye tamamlandı.

7) CO₂-hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti CO₂ çözeltisi : 0 °C'de yarım saat süreyle saf suyun içerisinde CO₂ gazı geçirilerek hazırlandı.

8) Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi : 100 mg Coomassie brilliant Blue G-250, 50 mL %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye %95'lik 100 mL fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi, saf su ile 1 litreye tamamlandı.

9) Poliakrilamitjelin boyanması için kullanılan çözelti boyama çözeltisi: 0,1 g Coomassie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.

10) Poliakrilamit jelin yıkanması için kullanılan çözelti yıkama çözeltisi: %10 asetik asit olacak şekilde metanol ve su karıştırılarak yeterli miktarda hazırlandı.

11) Jeldeki proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti sabitleştirme çözeltisi: %50 izopropanol, %10 TCA, %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.

12) Homojenatlar: *Nigella sativa* (çörek otu) homojenatları hazırlandı. Bunun için önce çörek otu havanda dövülüp toz haline getirildi. Üzerine dengeleme tamponu ilave edilerek karıştırıldı. Tülbent bezinde birkaç kez süzülüp, sıvı kısım katı parçacıklardan tamamen uzaklaştırılmaya çalışıldı. Sonra 18000-20000 rpm'de yarım saat santrifüj edildi. Üstteki sıvı (süper metant) damlalıklarla alınıp, homojenatımız hazır hale getirildi. Bu şekilde % 0,25 - % 0,50 - % 0,1 - % 0,2 - % 0,3'lük homojenatlar hazırlandı.

4.4 Yöntemler

4.4.1 Protein tayini

4.4.1.1 Kalitatif protein tayini

Kromatoğrafi işlemleri sonunda eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Bu metodun esası; 280 nm’de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorpsiyon göstermesine dayanmaktadır. Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorpsiyonları spektrofotometrede köre (ilgili tampon çözeltisi) karşı okundu.

4.4.1.2 Bradford (coomasie blue) yöntemi ile ilgili protein tayini

Bu yöntemle, afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisinde ve hemolizatta protein tayini yapıldı. Bu yöntem, coomasie brilliant blue G-250’ nin fosforik asitli ortamda proteinlere bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks, 595 nm’de maksimum absorpsiyon gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir (2 dakika). Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır (Bradford, 1976).

Tayin işlemlerinde; 1 mL’inde 1 mg protein ihtiva eden standart hemolizattan tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alındı ve saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 mL’ye tamamlandı. 5 mL coomasie reaktifi tüplere ilave edildi ve vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika sonra 595 nm’de 3 mL’lik küvetlere köre karşı absorpsiyon değerleri okundu. Köre olarak 0,1 mL aynı tampon ve 5 mL Coomasie reaktifinden oluşan karışım kullanıldı. Absorpsiyon değerlerine karşılık gelen mikrogram protein değerleri standart grafik halinde verildi.

4.4.2 Karbonik anhidraz aktivitesi tayini

4.4.2.1 CO₂- Hidrataz aktivitesi tayini

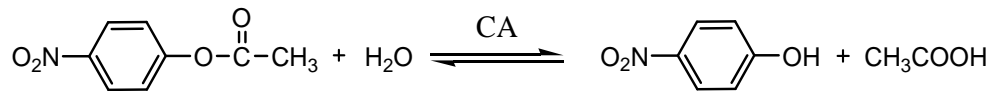
Aktivite tayini Wilbur Anderson metodu ile yapıldı. Bu yöntemde; CO₂'in hidratasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ sebebiyle pH' ın 8,2'den 6,3'e düşmesi için geçen süre, pH-stat metodu kullanılarak ölçüldü. Tampon olarak da, pH'sı 10 olan karbonat tamponundan (0,15 M Na₂CO₃ + 0,1 M NaHCO₃) yararlanıldı. Enzim birimi ise; enzimsiz CO₂ hidratasyon süresi (t₀) ile enzimli reaksiyon süresi (t_c) arasındaki farkın, t_c'ye bölünmesi ile belirlendi (Landolfi ve ark., 1998; Maren, 1960).

Deneyde reaksiyon tüpüne önce 1 mL veronal tamponu, 0,6 mL su, 0,1 mL enzim ve 2,5 mL doymun CO₂ çözeltileri konuldu. pH'metreden pH'nın 6,3 civarına düşmesi için geçen süre kronometre ile belirlendi (t_c). Aynı işlemler her numunenin çalışılmasından önce, enzim çözeltisi yerine saf su konularak yapıldı (t₀). İnhibitörlü çalışmalarda ise; suyun hacmi, kullanılan inhibitör hacmi, kadar azaltılarak yerine inhibitör eklendi. Böylece aktivite ölçüm ortamının hacmi sabit tutulmuş oldu (4,2 mL). Bu yöntemde göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (E.U), enzimsiz olarak meydana gelen CO₂ hidrasyonu süresini, yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

Yani; $EU=(t_0-t_c)/t_c$ formülüne göre kullanılan enzim çözeltisi hacmi için, enzim ünitesi hesaplanmıştır.

4.4.2.2 Esteraz aktivitesi tayini

İnhibitörlerin CA enzimi üzerindeki etkisini araştırmak için bu yöntem kullanıldı. Bu yöntem, karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Prencip olarak karbonik anhidraz, substrat olarak kullanılan p-nitro fenil asetatı, 348 nm'de absorbans veren p-nitro fenol veya p-nitro fenolat'a hidroliz etmektedir.



348 nm'de p-nitro fenol ve p-nitro fenolat'ın her ikisi de aynı absorbansı göstermektedir. Bu yüzden fenol grubundaki H⁺ iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir (Maren, 1967; James, 1993). Bu dalga boyundaki p-nitro fenil asetatın da çok az absorpsiyonu olduğundan, kör olarak kullanılmaktadır. Tayin işlemlerinde kuvartz küvetlere 1 mL substrat, 1,3 mL tampon, 0,6 mL su ve 0,1 mL enzim konulmasından üç dakika sonra 25 °C'de 348 nm'de absorbansı okundu. Spektrofotometre, daha önce enzim yerine 0,1 mL

tampon konularak, karışımın üç dakika sonraki absorbansı ile sifıra ayarlandı. Bu suretle üç dakika içinde esterin kendi kendine hidrolizlenen kısmı ve p-nitro fenil asetatın absorpsiyonu için düzeltme yapıldı. İnhibitörlü çalışmalarda ise suyun hacmi azaltılarak, yerine o miktarda inhibitör eklenerek aktivite tayinleri yapıldı.

Bu deneyde kullanılan p-nitro fenil asetat substrat çözeltisi, taze olarak hazırlandı. Bunun için 27,2 mg ester, 1 mL aseton içinde çözüldü ve hızlıca karıştırılan 49 mL destile suya yavaş yavaş eklendi. Bu çözelti 3 mM'lik olup, daha derişğini hazırlamak esterin sınırlı çözünürlüğü sebebiyle mümkün değildir. Aseton ise diğer organik çözücülere oranla hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden çözücü olduğu için seçildi (Armstrong ve ark., 1966). Enzim çözeltisinin tamponlanması 0,05M Tris-SO₄ (pH=7,4) çözeltisiyle yapıldı (Kohn ve Wilchek 1978). Esteraz aktivitesi için;

$$p - \text{Nitrofenol miktar} = \frac{A(OD) / 5}{3} \times 3 = A(OD) / 5 (\mu\text{mol} / \text{dakika})$$

4.4.3 Afinite jelinin hazırlanması

4.4.3.1 Sepharose-4B matriksi üzerinde afinite jelinin hazırlanması

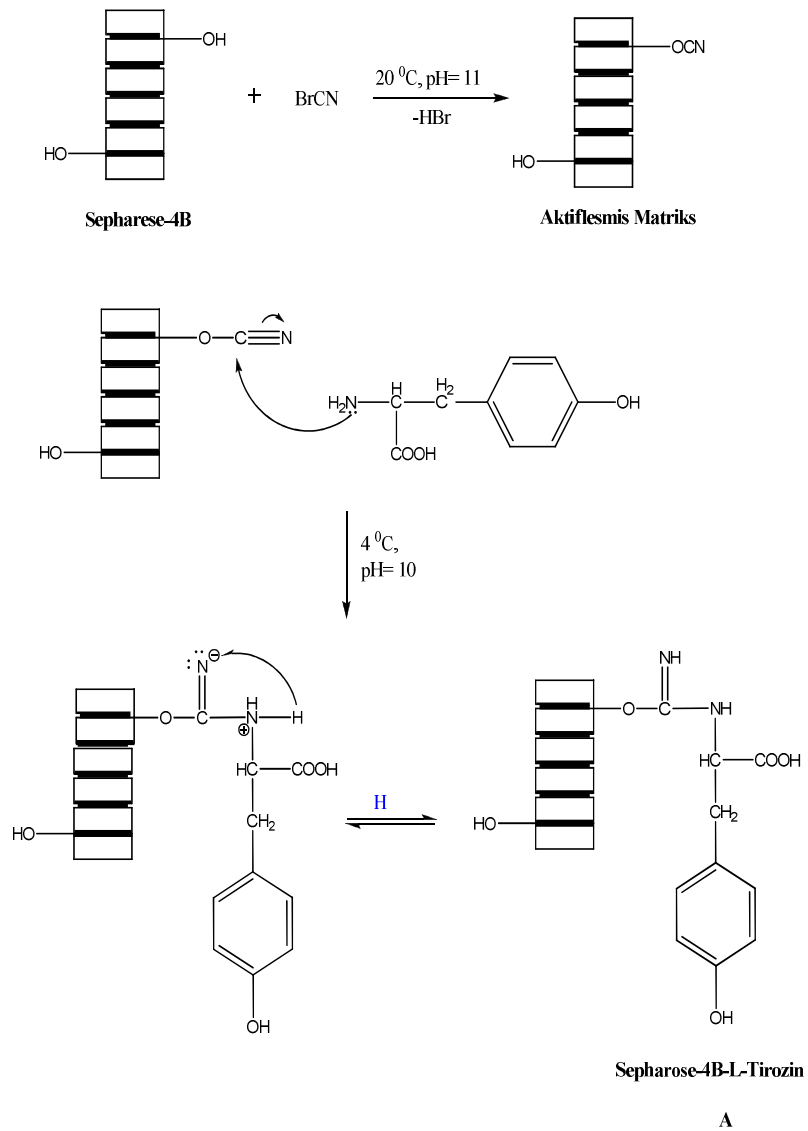
Afinite jeli, Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Sepharose-4B'nin CNBr ile aktifleştirilmesinden sonra, tirozin kovalent olarak takıldı. Daha sonra sülfanilamid diazolanarak, tirozine kenetlendi. Burada tirozin; afinite jelinin uzantı kolunu, sülfanilamid ise enzimi spesifik bağlayan kısmını oluşturmaktadır. Sülfanilamid karbonik anhidrazın spesifik bir inhibitörü olup, afinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılmasında başarıyla kullanılmaktadır (Kohn ve Wilchek 1978).

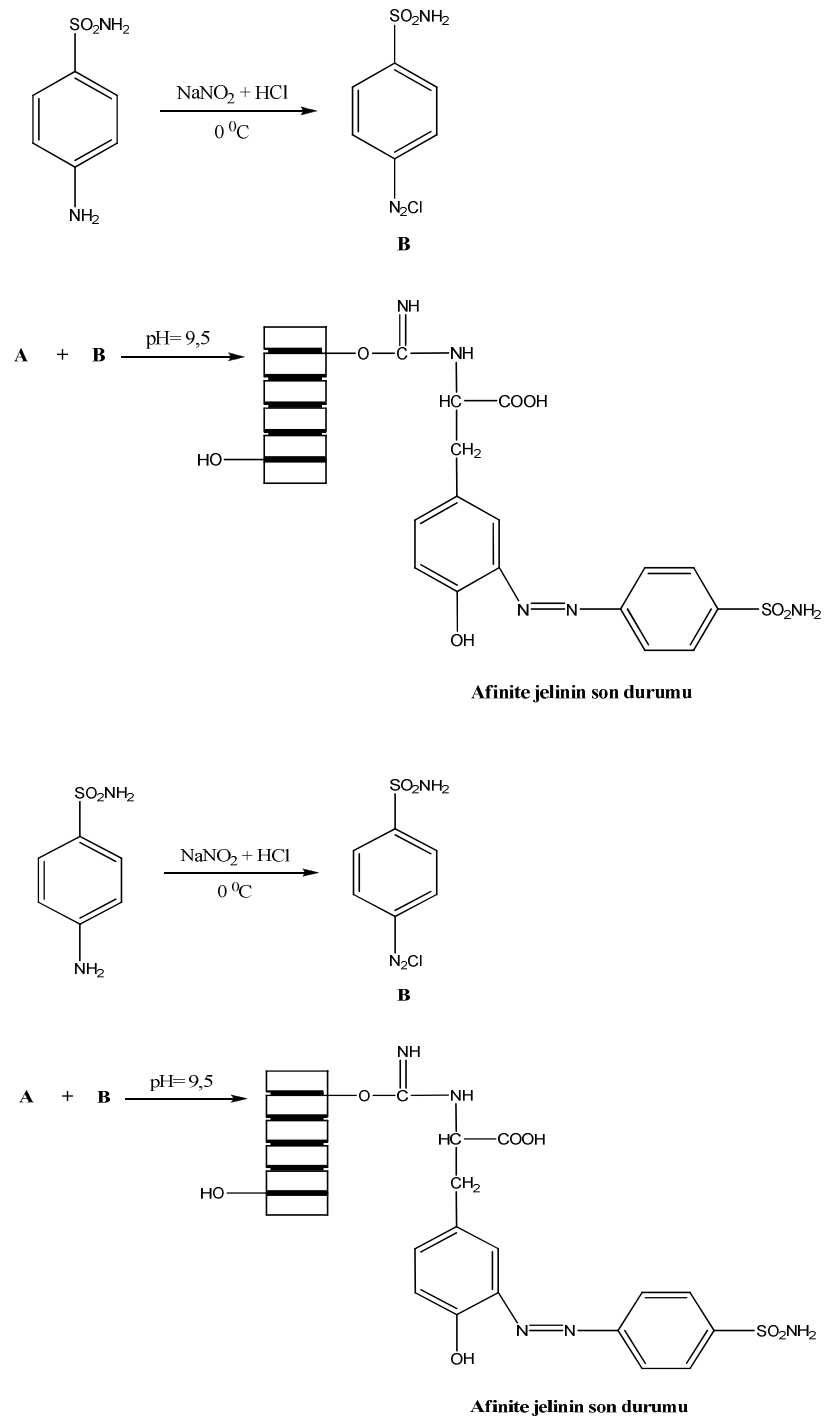
4.4.3.2 Sepharose-4B'nin aktifleştirilmesi ve tirozin takılması

Siyanür bromürle aktifleştirilmiş Sepharose-4B pH'sı 10 olan 250 mL 0,2 M NaHCO₃ tamponu ile yıkandı ve bir beher içerisine alındı. Aynı tamponun 20 mL'sinde, 80 mg tirozin çözüldü ve behere ilave edilerek karıştırıldı. Süspansiyon 4°C'de 2 saat süreyle karıştırıldı ve 16 saat aynı sıcaklıkta bekletildi. Bu sürenin sonunda jel, yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol suyla dekante edildi. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin, çözülden tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama işlemi 100 mL 0,2 M NaHCO₃ tamponu ile (pH=8,8) tekrarlandı ve tirozin takılı jel, aynı tamponun 40 mL'si içerisine alındı (Arslan ve ark., 1997; Küfrevioğlu ve ark., 1997; Laemmler, 1970).

4.4.3.3 Sülfanilamid kenetlendirilmesi

25 mg-sülfanilamid, 0 °C civarında 10 mL 1 M HCl içinde çözüldü. 75 mg NaNO₂ ihtiva eden 0 °C'deki 5 mL çözelti, sülfanilamid çözeltisine 10 dakikada damla damla katıldı. Diazolanmış bulunan sülfanilamid, 40 mL Sepharse-4B-L-tirozin süspansiyonuna eklendi. pH, 1 M NaOH ile 9,5'e çıkarılarak sabit tutuldu. 3 saat süreyle oda sıcaklığında yavaş yavaş karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf ve 200 mL 0,05 M tris-SO₄ (pH=7,4) tamponuyla yıkandı ve aynı tampon içerisinde muhafaza edildi (Cuatracases, 1970).





Şekil 4.1 Afinite jelinin hazırlanması.

4.4.4 İnsan eritrositlerinden karbonik anhidraz enzimlerinin saflaştırılması

4.4.4.1 Hemolizat eldesi

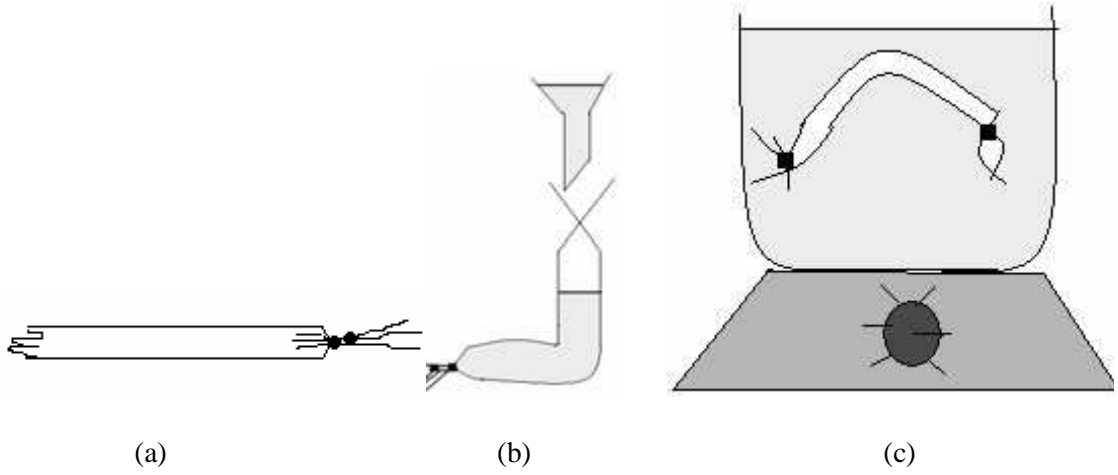
Kan, antikoagulanlı kan torbalarına alındıktan sonra 4°C’de muhafaza edildi ve 2 gün içerisinde tüketildi. Alınan kanın eritrositlerini ayırmak için 10 ml’lik tüplere konuldu ve 20 dk santrifüj edildi. Daha sonra tüplerin üst kısmındaki plazma ve lökosit tabakası birbirinden titizlikle ayrıldı. Sonra altta kalan eritrositler %0,9 luk NaCl çözeltisi ile birkaç defa yıkanıp üstteki kısımlar atıldı. Eritrositler hacimlerinin 1,5 misli 0°C’deki saf su ile hemoliz edildi. Hemoliz edilen eritrositler toplanarak hemolizin tam gerçekleşmesi için yarım saat süreyle karıştırıldı. Hücre zarlarının ayrılması için hemolizat 4°C’de 20.000 rpm’de yarım saat santrifüj edildi. Daha sonra tüplerin dibine çöken hücre zarları atılıp üstteki hemolizat dikkatlice alındı. Hücre zarlarından ayrılan hemolizatın pH’sı katı Tris ile 8,7’ye getirildi. Böylece hemolizat kolona yüklenecek duruma geldi.

4.4.4.2 Hemolizatın afinite kolonuna tatbiki ve enzimin elüsyonu

İşlemlerden geçen hemolizat kolona tatbik edilir. Kanın kolona yüklenme işlemi bittikten sonra yıkama tamponu ilave edilir. Yıkama işlemi kanın kırmızı rengi kolondan tamamen gidinceye kadar ve yıkama tamponuna karşı 280 nm de 0,05 değerine ulaşıncaya kadar sürdürülür. Bu değere ulaşıldığında sırasıyla HCA-I ve HCA-II enzimlerinin elüsyon çözeltileri kolondan geçirilir. Elüsyon her tüp için 5 ml şeklindedir. Elüsyondan alınan her tüpün 280 nm de absorbansına bakılır. Son olarak elde edilen enzimlere diyaliz işlemi uygulanır.

4.4.4.3 Diyaliz işlemi

Biyolojik moleküllerin ayırımında kullanılan ve seyreltik bir çözeltilerdeki moleküllerin boyutlarına göre ayrılması temeline dayanan işleme diyaliz denir. Bu teknikte kullanılan diyaliz torbasının porları genellikle molekül ağırlığı 10.000’den daha fazla olan makro moleküllerin geçişine izin vermeyecek kadar küçüktür. Bu nedenle, diyaliz tüpünün içindeki küçük iyonlar dışarı çıkarken, içeride ayrımı istenen molekülün konsantre bir çözeltisi kalır. Küçük moleküllerin çıkışı tüpün içi ile dıştaki tamponun konsantrasyonları eşit oluncaya kadar devam eder. Dengeye ulaşmak için genellikle 4-6 saatlik sürenin geçmesi gerekmektedir. Dengeye ulaşıldıktan sonra, dışarıdaki çözelti taze tamponla değiştirilir ve diyalize devam edilir. Böylece, istenilen ayırım tamamlanıncaya kadar diyaliz 1-2 gün sürdürülebilir (Temizkan ve Arda, 2004).



Şekil 4.2 Diyaliz işleminin uygulanması.

- a) Diyaliz torbasının hazırlanması,
- b) Enzim çözeltisinin konulması,
- c) Diyalize bırakılma

Diyaliz için kullanılan yarı geçirgen zarlar (diyaliz tüpleri veya torbaları) çeşitli materyallerden (sellofan, selüloz) yapılmış malzemelerdir. Por çapı zardan geçecek moleküllerin büyüklüğüne göre belirlenir. Diyaliz yöntemi, genellikle çözeltilerdeki tuzları ve diğer küçük molekülleri ortamdaki uzaklaştırmakta kullanılır. Ayrıca, biyolojik moleküllere zayıf olarak bağlı olan küçük iyonlar ve molekülleri de bu yöntemle ortamdaki uzaklaştırmak mümkündür. Çalışmamızda elde edilen enzim çözeltisi diyaliz torbasına doldurulmuş ve 4°C'da diyaliz tamponu kullanılarak diyaliz işlemi yapılmıştır. 24 saat boyunca işleme devam edilmiş ve her 8 saatte bir diyaliz tamponu değiştirilmiştir. Diyaliz işlemleri sonucu elde edilen enzim artık kısmen saf hale getirilmiştir. Elde edilen bu enzim çözeltisi, yapacağımız diğer işlemlerde kullanılmak üzere 3'er mililitrelik tüplere konmuş ve -20 °C'da derin dondurucuda depolanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

İnsan kanından elde edilen hemolizatlar kolona direk olarak tatbik edildi. Jelin kolona yerleştirilmesi, tamponla dengelenmesi ve yıkama işleminden sonra HCA-I, 0,025 M Na₂HPO₄ /1 M NaCl, (pH=6,3) tamponu ile HCA-II; 0,1 M NaCH₃COO/0,5 M NaClO₄ (pH=5,6) tamponuyla elüe edildi. Eliüatlar 5 mL'lik fraksiyonlar halinde toplanarak, her tüpteki numune için 280 nm'de kalitatif protein tayini yapıldı. Absorbans gösteren tüplerde CO₂-hidrataz aktivitesine bakıldı.

5.1 İnsan Eritrositlerinden Elde Edilen HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez Sonuçları

Elektrofrez, belirli bir pH' da ve belli bir elektrik alanında yüklü taneciklerin farklı hızlarda yürüyerek ayrılmaları tekniğidir. Ortamın pH' ı tampon çözelti ile elektrik alanı ise, doğru akım veren bir güç kaynağından sağlanır. Elektrofrezde ayırım, kütle ile ters ve yükü doğru orantılıdır. Bu yüzden proteinler farklı yük ve kütlere sahip olduklarından elektrofrezle ayrılabilir.

Değişik elektofrez çeşitleri vardır

1. Kağıt elektrofrez: Özellikle aminoasit'leri ayırmada kullanılır.
2. Selüloz asetat elektrofrez: Klinik amaçla kullanılıyor.
3. Yüksek gerilimli kağıt elektrofrez: Özellikle aminoasitler için kullanılır.
4. Nişasta elektrofrez: Süt proteinlerinin ayrılmasında kullanılır.
5. Poliakril amid jel elektrofrez(PAGE): Proteinlerin ayrılmasında kullanılır.

Poliakril amid jeli ile %3-30'luk jel hazırlanabilir.

Poliakrilamid jel üç farklı şekilde hazırlanır:

1. Jelin hazırlandığı ortama göre: Slab jel, disk jel
2. Şartlara göre: Tabii şartlar, denatüre edici şartlar
3. Jelde akrilamid konsantrisine göre: Kesiksiz jel, Kesikli jel

SLAB JEL: İki tabaka arasında oluşturulan jelir.

DİSK JEL: Tüplerde yapılır.

TABİ ŞARTLAR: Şartlar uygun şekilde getirilerek proteinin tabii hali muhafaza edilir. Bu şartlarda elektofrez, soğukta yapılır ve denatüre edici bütün şartlardan korunur. Bu elektrofrezde, izoenzim çalışmaları yapılır. Bir izoenzimle çalışıldığında, proteinler ayrıldıktan

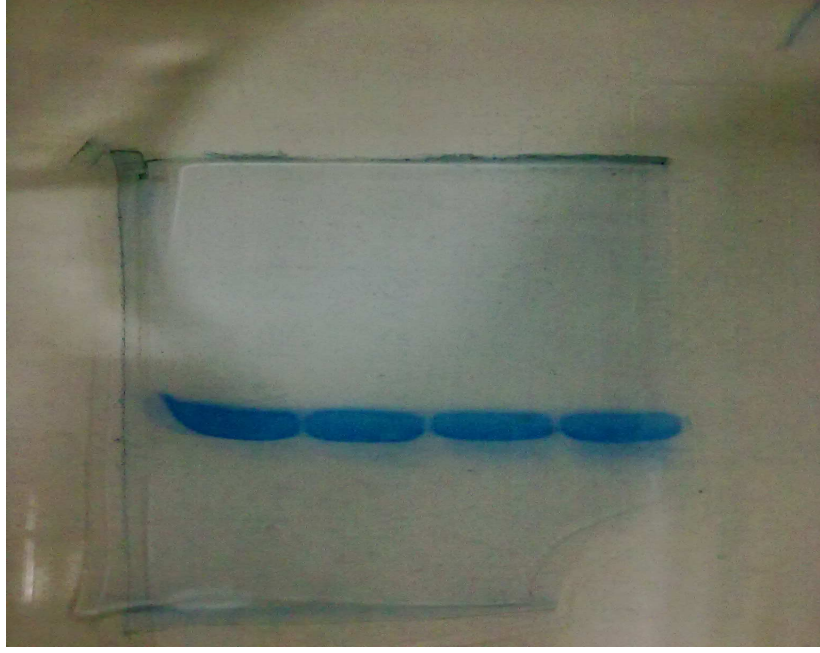
sonra jel enzime spesifik substrat çözeltisine daldırılır. Enzimin olduğu yerler renklenerek bant oluşturulur.

Denatüre edici şartlarda ise; ortama SDS katarak ve aynı zamanda β -merkapt etanol ile β -sülfit bağları parçalanarak, protein denatüre edilir. Ayrım; yük esasına göre değil, molekül büyüklüğüne göre olur. Çünkü SDS; her üç peptid bağına karşılık, bir SDS molekülü bağlanacak şekilde ortamda bulunduğundan, proteinler tamamen SDS yükü ile yüklenmiş olurlar. SDS, yük farkını ortadan kaldırır. Proteinin ne derece saflaştığını anlamak için SDS-PAGE elektroforezi uygulanır.

Kesiksiz jelde; bütün jel boyunca akril amid konsantrasyonu sabittir. Kesikli jelin, üst kısmına yığıma jeli, alt kısmına ayırma jeli denir. Kesikli jel daha avantajlıdır, bantlar daha nettir.

Jelde proteinler yürütüldükten sonra, yerlerini belirlemek üzere Coomassie brilliant blue R-250 veya Coomassie brilliant blue G-250 ihtiva eden bir çözelti içinde bir buçuk saat karıştırılır. Bu sırada; hem protein olan yerler hem de zemin renklenir. Daha sonra jel; renksizleştirme çözeltisi içine konarak (CH_3COOH , CH_3OH , H_2O) karışımı, uzun süre çalkalanır. Bu esnada, zeminin rengi açılarak, proteinlerin olduğu yerlerde bantlar oluşturur. Asetik asit, metanol ve su karışımı boyalı iken; aktif karbon'dan geçirildiğinde, maviyi tutar ve yeniden çözelti elde edilebilir. SDS-PAGE jel elektroforezi yapılarak, sonuçta tek bandın oluşması, enzimin saf olduğunun işaretidir.

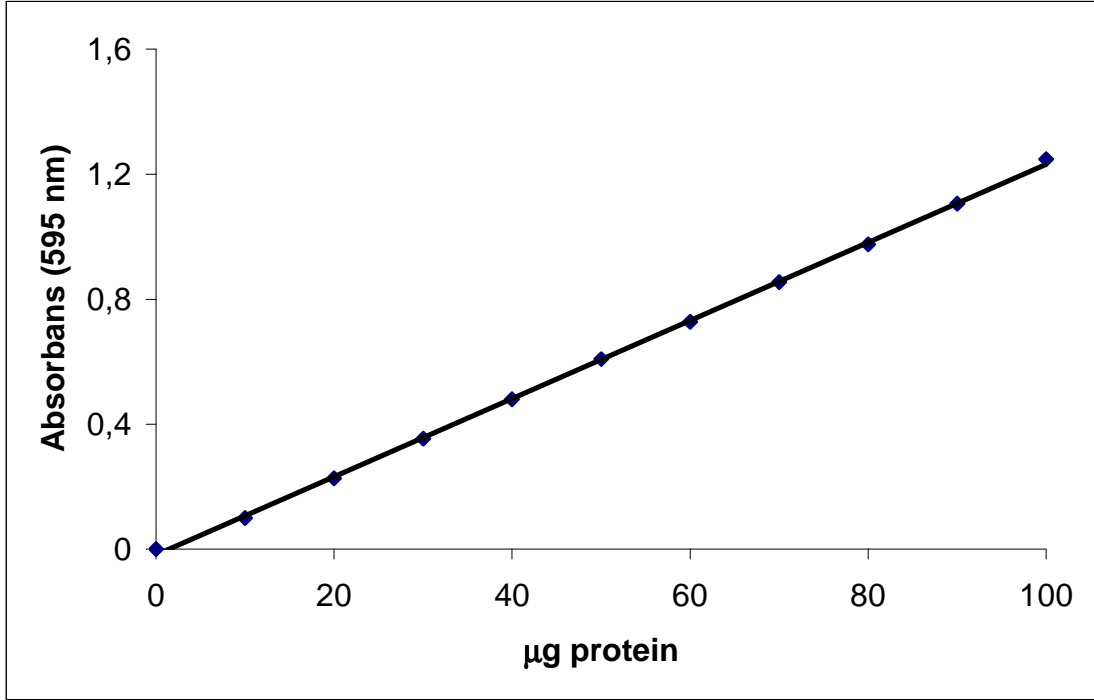
Bizim elektroforez işlemimizde, afinite kolonundan saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Bunun için hazırlanan kesikli SDS- poliakrilamid jel elektroforezine, insan kanından saflaştırılan izoenzimler tatbik edildi. Belirginleşen protein bantlarının fotoğrafı çekildi (Şekil 5.1).



Şekil 5.1 Afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz izoenzimlerinin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi fotoğrafı.

1. Kanal- HCA-I Standart,
2. Kanal- HCA-I numune,
3. Kanal-HCA-II Standart,
4. Kanal-HCA-II numune.

Kantitatif protein tayini Bradford yöntemi ile yapıldı. Bu yöntemde önceden yapılan çalışmalar sonucunda hazırlanan standart grafikten yararlandı. Hemolizatta ve saflaştırılan enzim çözeltilerindeki protein miktarları bu eğriye göre belirlendi. Standart çözeltideki mikrogram proteine karşılık gelen absorbans değerlerinden faydalanarak, ölçülen absorbans değerlerine karşılık gelen μg protein miktarları bulundu (Şekil 5.2).

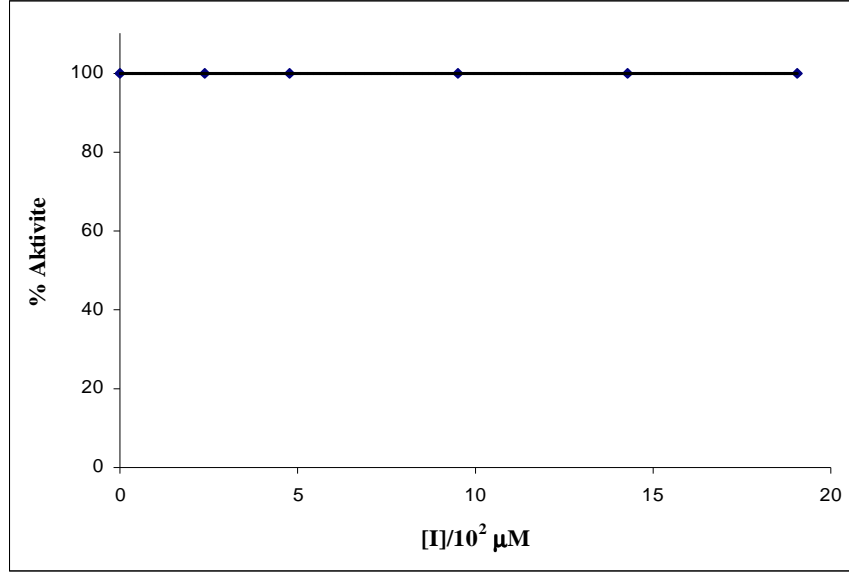


Şekil 5.2 Ölçülen absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein miktarları.

5.1 *Nigella sativa* (çörek otu)'nın Karbonik Anhidraz Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

5.1.1 *Nigella sativa* (çörek otu)'nın karbonik anhidraz enziminin hidrataz aktiviteleri üzerindeki etkisinin araştırılması

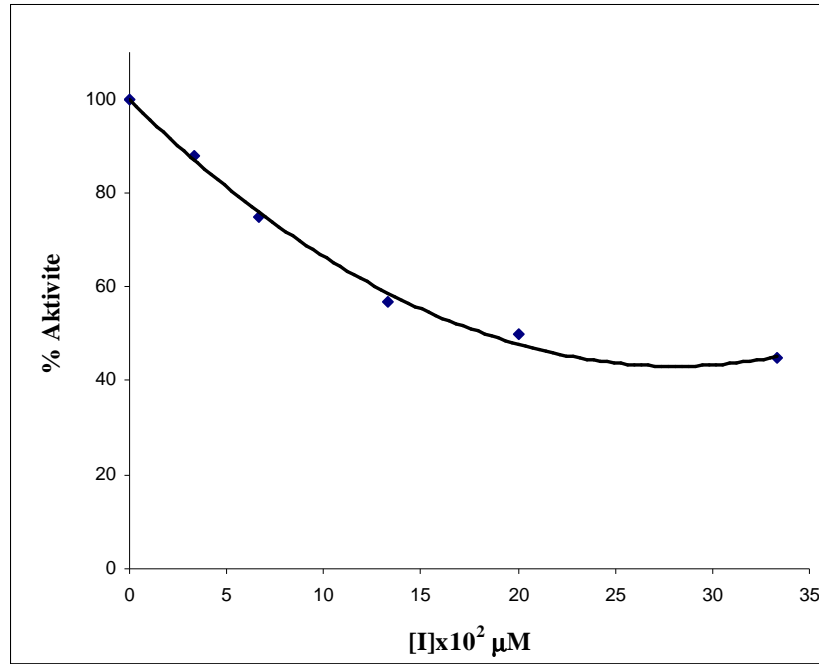
İnsan eritrosit HCA-I ve HCA-II enzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerinde *Nigella sativa* homojenatlarının inhibisyon etkileri, enzim üzerine tatbik edilmek suretiyle araştırıldı. Bunun için insan kanından elde edilen HCA-I ve HCA-II enzimleri için beş farklı konsantrasyonunda hidrataz aktivite ölçümü yapıldı. Değişik konsantrasyonlardaki çayın %Aktivite-inhibitör konsantrasyonu [I] grafikleri çizildi. Bu grafiklerde *Nigella sativa* homojenatlarının eritrosit CA'nın hidrataz aktivitesi üzerine etkisi olmadığı görüldü ve örnek grafik olarak aşağıdaki grafik verildi.



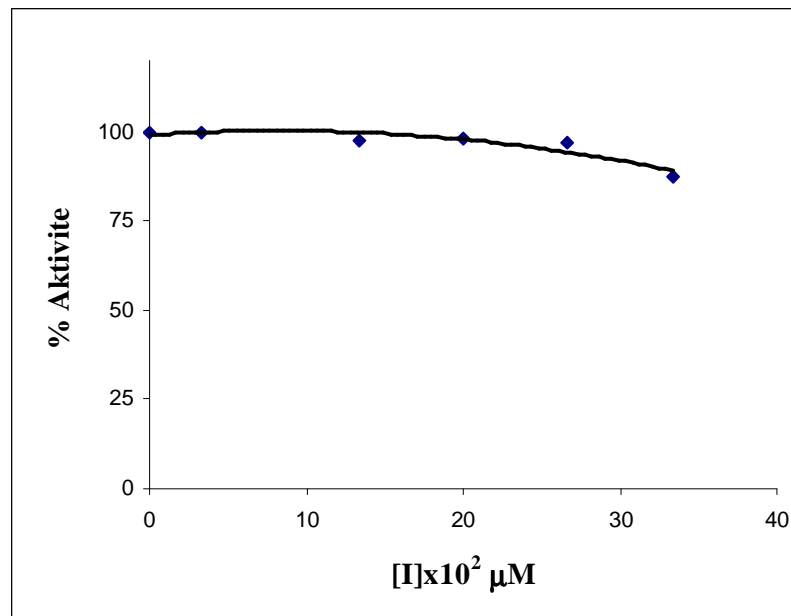
Şekil 5.3 HCA-I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine %0,25 *Nigella sativa* homojenatının etkisi.

5.1.2 *Nigella sativa* (çörek otu)'nın Karbonik Anhidraz Enziminin Esteraz Aktiviteleri Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

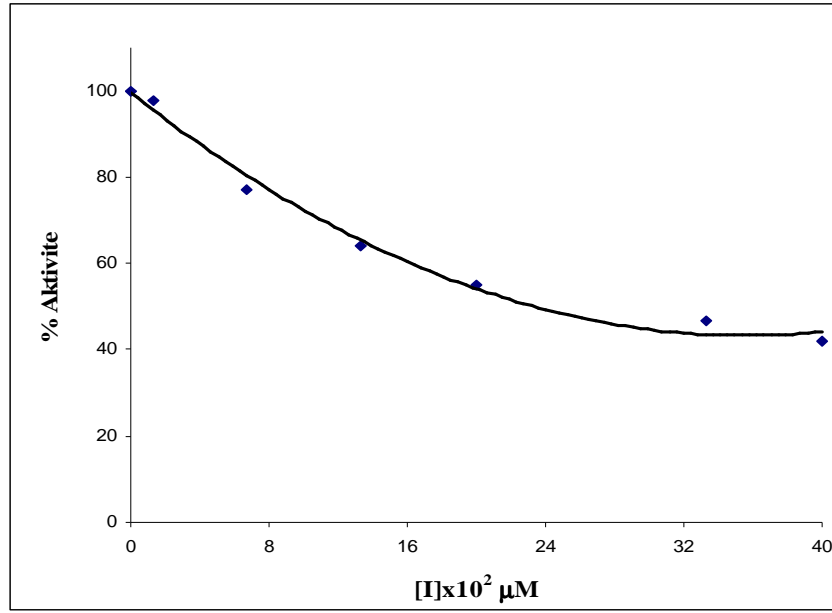
HCA-I ve HCA-II izoenzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerinde *Nigella sativa* homojenatlarının inhibisyon etkileri, enzim üzerine tatbik edilmek suretiyle araştırıldı. Bunun için insan kanından elde edilen HCA izoenzimleri için beş farklı uygun konsantrasyonda esteraz aktivite ölçümü yapıldı. HCA aktivitesine etkisi olan bileşiklerin % Aktivite-inhibitör konsantrasyonu [I] grafikleri çizildi.



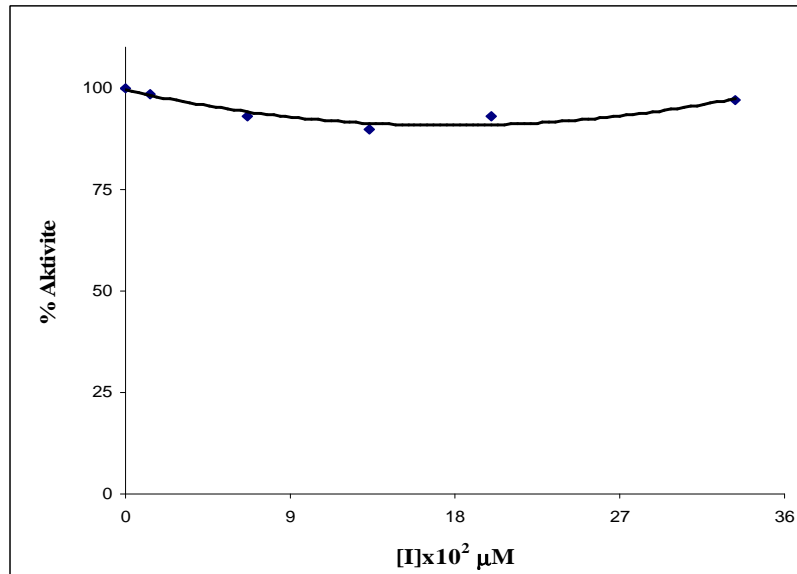
Şekil 5.4 HCA-I enziminin esteraz aktivitesi üzerine %0,25'lik *Nigella sativa* homojenatının etkisi.



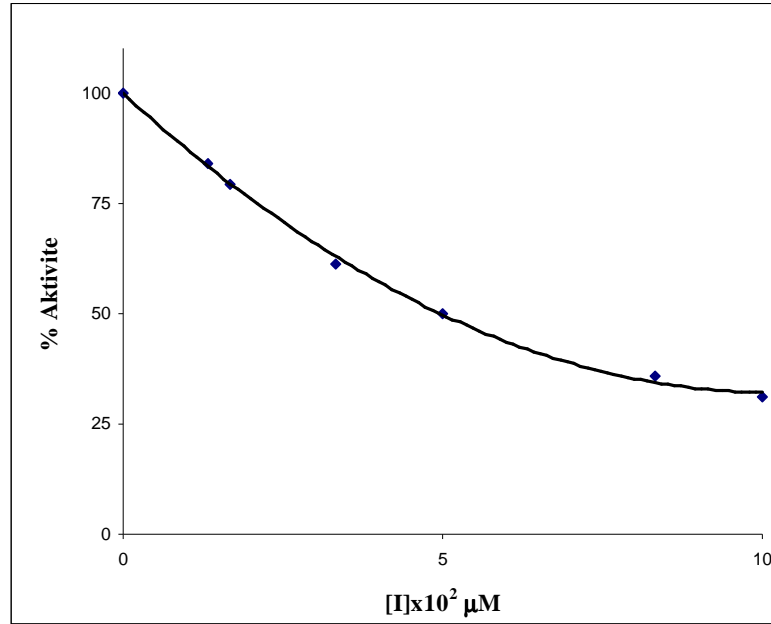
Şekil 5.5 HCA-II enziminin esteraz aktivitesi üzerine %0,25'lik *Nigella sativa* homojenatının etkisi.



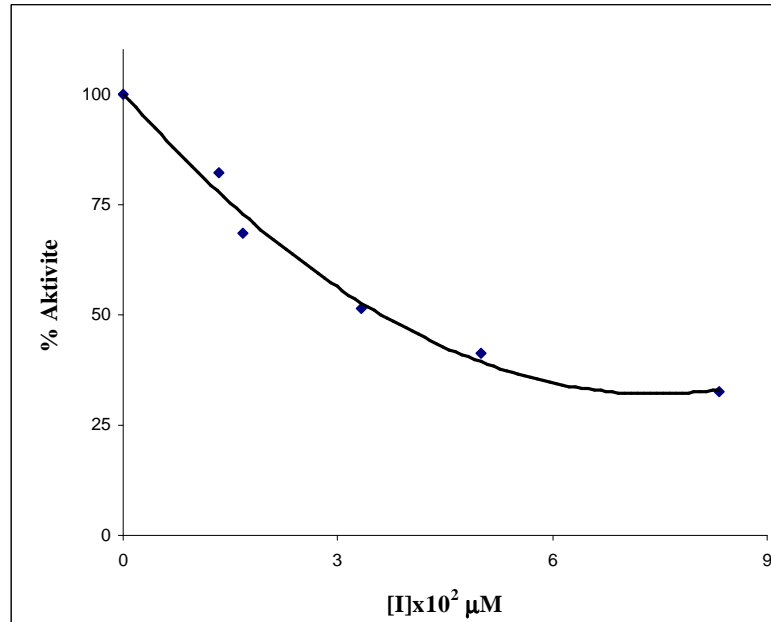
Şekil 5.6 HCA-I enziminin esteraz aktivitesi üzerine %0,5'lik *Nigella sativa* homojenatının etkisi.



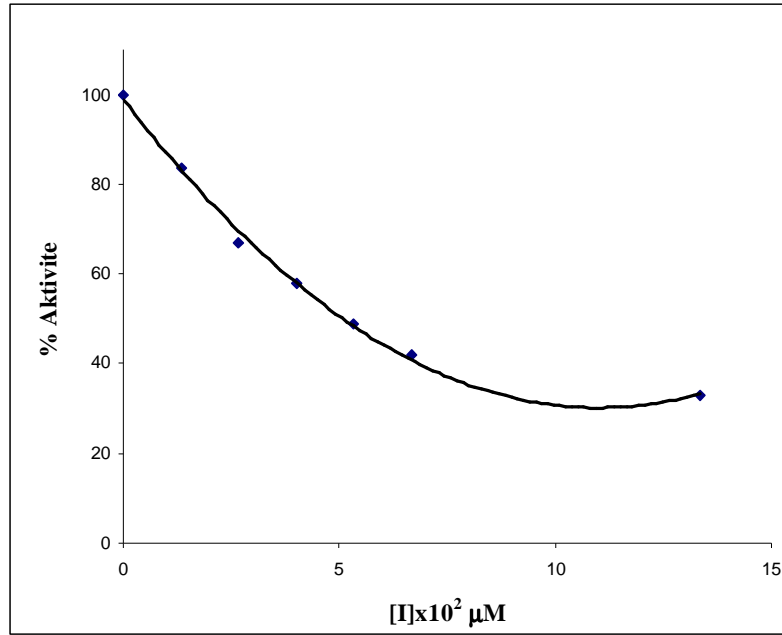
Şekil 5.7 HCA-II enziminin esteraz aktivitesi üzerine %0,5'lik *Nigella sativa* homojenatının etkisi.



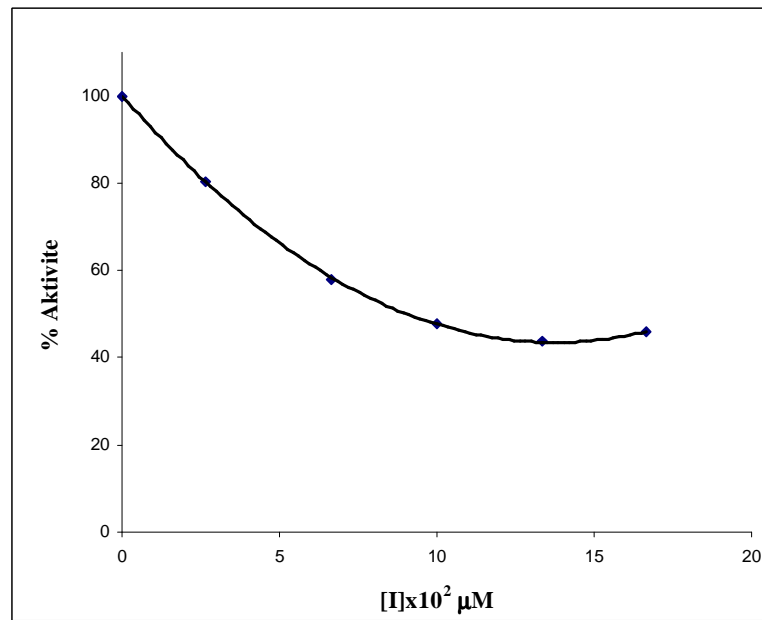
Şekil 5.8 HCA-I enziminin esteraz aktivitesi üzerine % 1'lik *Nigella sativa* homojenatının etkisi.



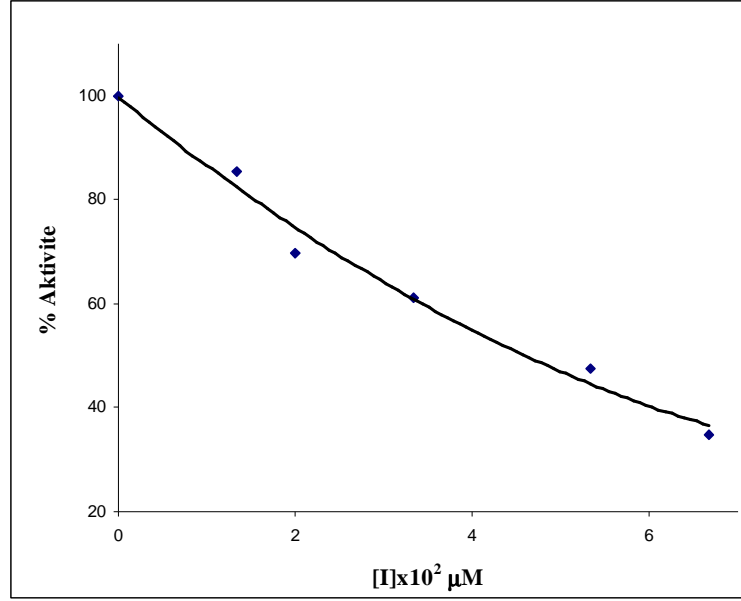
Şekil 5.9 HCA-II enziminin esteraz aktivitesi üzerine % 1'lik *Nigella sativa* homojenatının etkisi.



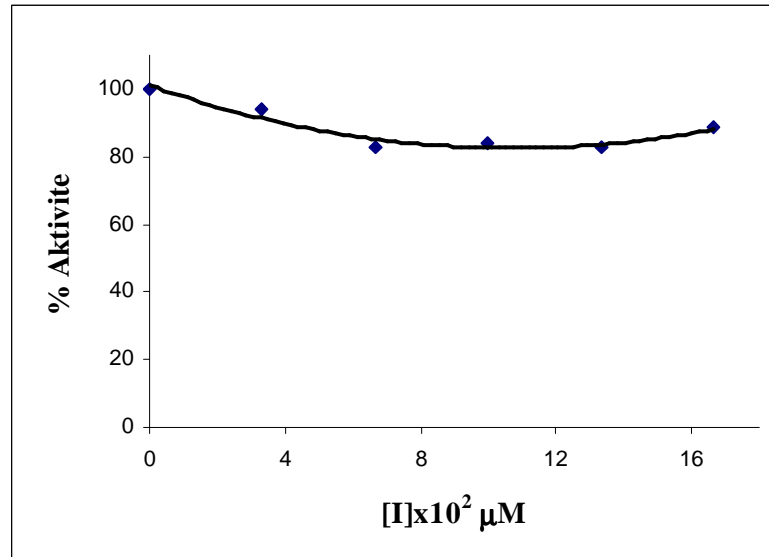
Şekil 5.10 HCA-I enziminin esteraz aktivitesi üzerine %2'lik *Nigella sativa* homojenatının etkisi.



Şekil 5.11 HCA-II enziminin esteraz aktivitesi üzerine %2'lik *Nigella sativa* homojenatının etkisi.



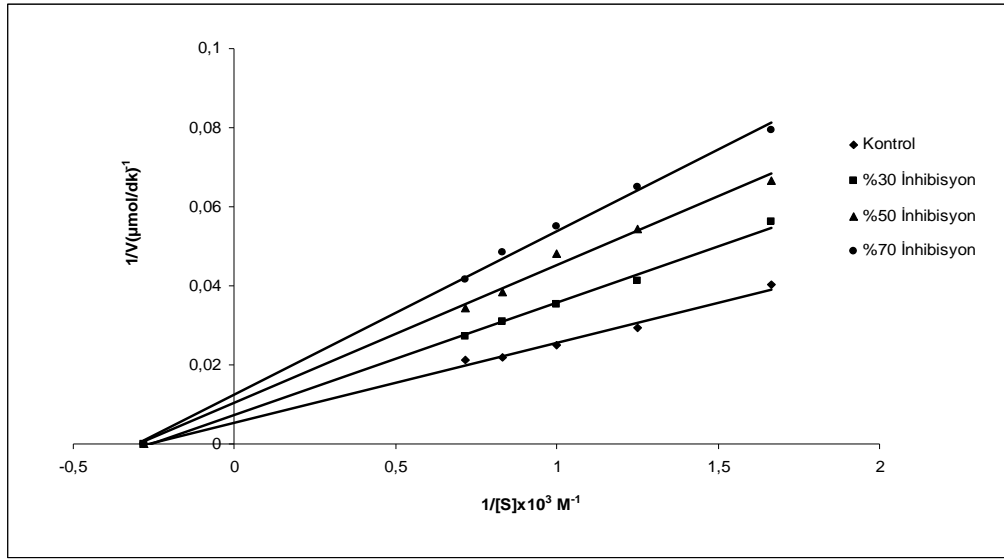
Şekil 5.12 HCA-I enziminin esteraz aktivitesi üzerine %3'lük *Nigella sativa* homojenatının etkisi.



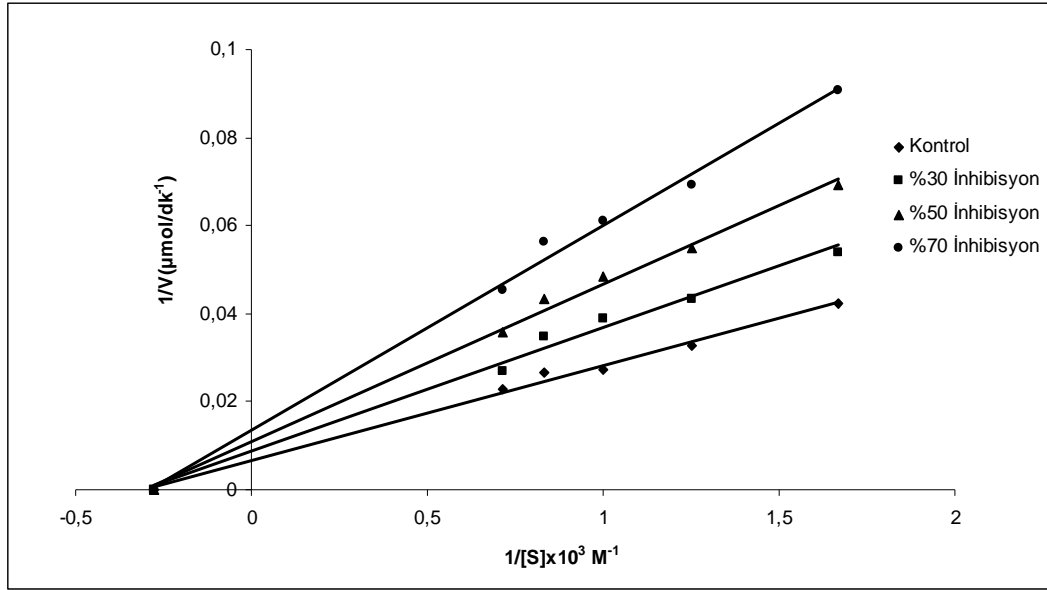
Şekil 5.13 HCA-II enziminin esteraz aktivitesi üzerine %3'lük *Nigella sativa* homojenatının etkisi.

5.1.3 *Nigella sativa*'nın insan karbonik anhidraz enzimlerinin esteraz aktivitesi üzerindeki etkisinin araştırılması çalışmalarından K_i sabitlerinin bulunması

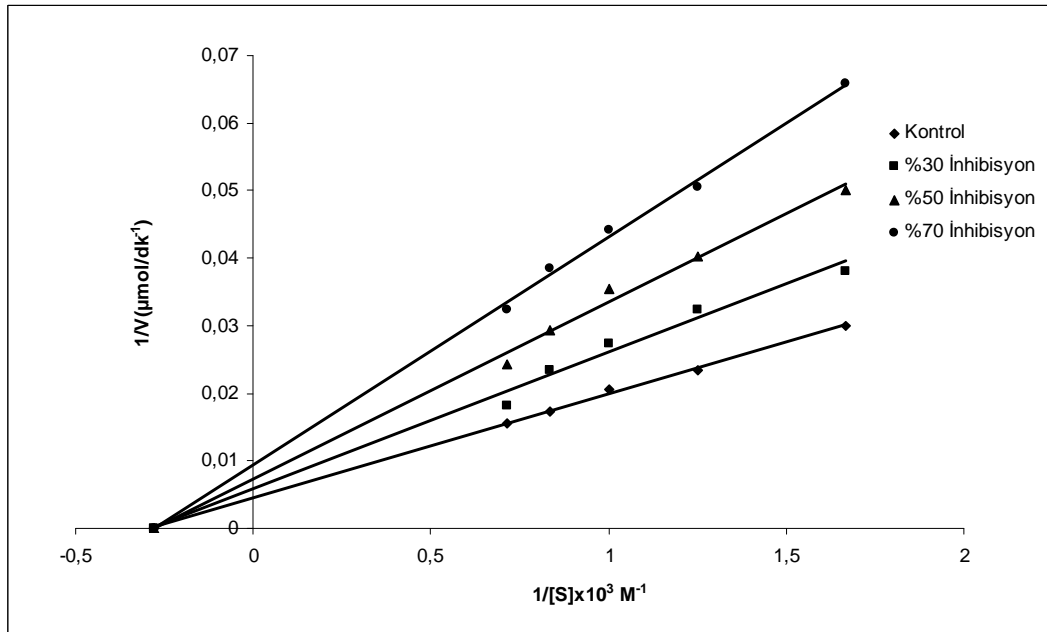
%1, %2 ve %3'lük konsantrasyondaki homojenatlar için üç farklı sabit konsantrasyonda ve 5 farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen HCA-I enziminin aktivite değerleri kullanılarak; $1/V-I/S$ değerleri hesaplandı. Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_i değerleri hesaplandı.



Şekil 5.14 HCA-I enzimi üzerinde %1 konsantrasyonundaki *Nigella sativa* homojenatının Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 5.15 HCA-I enzimi üzerinde %2 konsantrasyonundaki *Nigella sativa* homojenatının Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 5.16 HCA-I enzimi üzerinde %3 konsantrasyonundaki *Nigella sativa* homojenatının Lineweaver-Burk grafiği.

6. SONUÇ VE TARTIŞMA

Karbonik anhidraz (CA) (karbonat hidroliz E. C. 4. 2. 1. 1) eritrositleri de içine alan pek çok dokuda pH düzenleyici enzim olarak karakterize edilen Zn^{+2} iyonlu bir metaloenzimdir. İlk defa memelilerin eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz (CA); canlılarda CO_2 'in hidrasyon ve HCO_3^- 'ın dehidrasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen bir enzimdir.

Nigella sativa (çörek otu)'nın klinik olarak araştırılmış ve günümüzde bulunmuş birçok etkisi vardır. Vücutta çevresel etkilerden dolayı oluşan serbest radikaller önemli biyolojik yapılarda oksidatif hasara yol açar. Hücreler bu serbest radikallerin toksik etkilerinden antioksidan mekanizmaları ile korunurlar.

Nigella sativa'nın vücutta antioksidan olarak etki eden maddelerce zengin olduğu belirtilmiştir. *Nigella sativa* homojenatındaki etkin bileşenlerden bazıları; thymoquinone, karvakrol, t-anetol, 4-terpineol maddeleridir. Bu maddeler birçok klinik etkinliğe sahip maddelerdir. Spesifik olmayan hidrojen atomu ya da elektron nakline 2,2'-difenil-p-picrylhydrazyl (DPPH) deneyinde test edildiğinde, bu dört bileşen ve uçucu yağın değişken antioksidan aktiviteye sahip oldukları ortaya çıkmıştır. Yağ örnekleri esas olarak değişken antioksidan etki göstermiştir. 'Kanıtı dayalı bitkisel ilaç' ortak uygulamalara göre çörek otunun uçucu yağ biyoaktif bileşeni thymoquinone'dur.

İnsan eritrositlerindeki CA enzimi Sephrose-4-B-tirozin-sülfanilamid afinite kolonu uygulanarak saflaştırıldı. Elde edilen enzimler için elektroforez işlemi yapıldı. Enzimlerin yüksek saflıkta elde edildiği tek noktada bulunmalarından ve sürüklenme olmamasından dolayı kanıtlandı.

Enzim aktivitesi tayini için iki farklı yöntem kullanılmıştır. Bunlardan birincisi hidrataz aktivitesidir. Bu yöntemle CO_2 'nin H_2O ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelen H_2CO_3 'ün H^+ ve HCO_3^- iyonlarına ayrışarak ortamın pH' sını değiştirme süresi ölçülmektedir. Bu aktivite tayininde yarışmalı inhibisyon türü gözlenmektedir. Bunun nedeni karbondioksit molekülü direkt Zn^{+2} 'ye bağlı OH grubuna bağlanmaktadır. Sülfonamid inhibitörleri de aynı bölgeye bağlanacağından inhibitörle substrat enzime bağlanma konusunda yarış halindedir. İkinci yöntem ise esteraz aktivitesi ölçümüdür. Bu yöntemin esası karbonik anhidraz enziminin ester bağlarının parçalanmasına dayanmaktadır. CA enzimi p-nitrofenil asetatı p-nitrofenole hidroliz etmekte ve bu da 348 nm'de absorpsiyon vermektedir.

Bu çalışmada kullanılan *Nigella sativa* homojenatları ise %0,25, %0,5, %0,1, %0,2, %0,3'lük konsantrasyonlarda hazırlandı. Homojenatların esteraz ve hidrataz aktiviteleri ölçüldü. Homojenat konsantrasyonlarının hiçbirinde hidrataz aktivitesi saptanmadı. Esteraz aktivitesinde ise HCA-I enzim aktivitesi üzerine, düşük konsantrasyonlardaki homojenatlar uygulandığında bir miktar inhibisyon etkisinin olduğunu, yüksek konsantrasyonlara doğru gidildikçe inhibisyon etkisinin daha da arttığı gözlenmiştir. Yani, homojenatlar HCA-I enzimi için inhibisyon etkisi göstermiştir diyebiliriz.

Bir inhibitörün, inhibisyon etkisini belirlemede IC_{50} değerleri kullanılmaktadır. Tüm homojenatlar HCA-II enzimi esteraz aktivitesi üzerinde çok az miktarda inhibisyon etkisi göstermiştir. HCA-II enzimlerinde, HCA-I enziminde olduğu kadar inhibisyon görülmemiştir, çoğunda IC_{50} değerleri hesaplanamamıştır. Tabloda, tüm homojenatların HCA-I enzim aktivitesi üzerindeki IC_{50} değerleri verilir, piyasada glökom tedavisinde kullanılan asetazolamid ve tedavi için bir ön madde olan tiyadiazol'un IC_{50} değerleri de verilmiştir ve karşılaştırma yapılmıştır (Çizelge 6.1).

Çizelge 6.1 *Nigella sativa* (çörek otu) % 0,25, % 0,5, % 0,1, % 0,2, % 0,2 ve % 0,3 konsantrasyonlarındaki homojenatlarının IC_{50} değerleri.

Esteraz IC_{50} (μ M)	
Inhibitör	HCA-I
asetazolamid	$0,0042.10^4$
tiyadiazol	$0,0061.10^4$
% 0,25	$0,2101.10^4$
% 0,5	$0,2000.10^4$
% 1	$0,0541.10^4$
% 2	$0,0510.10^4$
% 3	$0,0492.10^4$

HCA-I esteraz aktivitesine göre inhibisyon gösteren tüm konsantrasyonların IC_{50} değerleri sırasıyla (enzimli reaksiyon süresini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu); $0,2101.10^4 \mu$ M, $0,2000.10^4 \mu$ M, $0,0541.10^4 \mu$ M, $0,0510.10^4 \mu$ M, $0,0492.10^4 \mu$ M bulunmuştur.

%1, %2 ve %3'lük konsantrasyonlardaki homojenatların HCA-I enzim aktivitesi için K_i değerleri hesaplanıp, Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir. Aşağıdaki tabloda %0,1, %0,2, %0,3'lük *Nigella sativa* konsantrasyonlarının, HCA-I enzimi esteraz aktivitesi üzerinde in vitro inhibisyon etkisinin K_i değerleri verilmiştir. HCA-II enzimleri üzerinde ise tüm konsantrasyonlarda yeterli inhibisyon görülmemiştir. Yukarıdaki tabloda olduğu piyasada

glokom tedavisinde kullanılan asetazolamid ve ilaç yapımı için bir ön madde olan tiyadiazol bileşiklerinin inhibisyonları da verilmiştir ve karşılaştırma yapılmıştır (Çizelge 6.2).

Çizelge 6.2 *Nigella sativa* (çörek otu)'nın % 1, % 2, % 3'lük homojenat konsantrasyonlarındaki K_i değerleri.

K_i Değerleri (μM)	
İnhibitör	HCA-I
asetazolamid	$0,031 \cdot 10^2$
tiyadiazol	$0,044 \cdot 10^2$
% 1	$4,290 \cdot 10^2$
% 2	$4,060 \cdot 10^2$
% 3	$3,980 \cdot 10^2$

%0,1, %0,2, %0,3'lük konsantrasyonlardaki *Nigella sativa* homojenatlarının HCA-I üzerindeki inhibisyon etkisi incelendiğinde sırasıyla, $K_i = 4,290 \cdot 10^2 \mu\text{M}$, $K_i = 4,060 \cdot 10^2 \mu\text{M}$ ve $K_i = 3,980 \cdot 10^2 \mu\text{M}$ 'dir.

Çalışmalar sonucunda, çalıştığımız tüm konsantrasyonlarda HCA-I esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir, fakat HCA-II enzim aktivitesi üzerinde IC_{50} ve K_i hesaplamaları için yeterli inhibisyon görülmemiştir. Ayrıca araştırma sonuçları, asetazolamid ve tiyadiazol bileşiklerinin inhibisyon etkileriyle karşılaştırıldığında arada açık fark vardır. Çalışılan %0,25, %0,5, %0,1, %0,2, %0,3'lük konsantrasyonlardaki homojenatlar bu bileşiklerin inhibisyon değerlerine ulaşmamıştır, homojenatlar bu bileşiklere göre çok daha az inhibisyon etkisi göstermiştir. Konsantrasyonlar arttırıldığında inhibisyon etkisi artabilir fakat yüksek konsantrasyonlarda vücuttaki diğer enzimlerden de inhibisyon gözlenebilme ihtimalinden dolayı aşırı dozda alınması zararlı olabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- [1] Abou Basha L., MS., Aboul-Enein HY. Rashed 1995, the determination of black seed oil and thymoquinone and thymol dithymoquinone Thin Layer Chromatography test. J Chromatogr fluid 18, 105-115.
- [2] Advances in Phytomedicine, Volume 2, 2006, Pages 133-153 Hala Gali-Muhtasib, Nahed El-Najjar, Regine Schneider-Stock.
- [3] Aggarwal BB., Kunnumakkara AB., Harikumar KB., Tharakan ST., Sung B., Anand P. 2008, Cancer Prevention Potential of Spice-Derived Phytochemicals. Planta Med 8 July [Epub ahead of print].
- [4] Amala Nagar, P.O., 2008, Amala Cancer Research Centre, Thrissur 680 553, Kerala India.
- [5] Armstrong, J., Mc, D., Myers, D. V., Verpoorte, J. A., and Edsall, J. T., 1966, Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase. J. Biol. Chem., 214, 5137 p..
- [6] Arslan, O., Küfrevioğlu, Ö. İ. and Nalbantoğlu, B., 1997, Synthesis and Investigation of Inhibition Effects of New Carbonic Anhydrase Inhibitors. Bioorg. Med. Chem., 5, 515 – 518 p.
- [7] Arslan, O., Nalbantoğlu, B., Demir, N., Özdemir, H. and Küfrevioğlu, Ö. İ., 1997, A new method for the purification of carbonic anhydrase isozymes by affinity chromatography. Tr. J. of Med. Sci., 27, 559 p.
- [8] Boriack-Sjodin, P. A., Heck, R. W., Laipis, P. J., Silverman, D. N. and Christianson, D. W., 1995, Structure determination of murine mitochondrial carbonic anhydrase. V at 2.45-Å resolution: implications for catalytic proton transfer and inhibitor design. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 92, 10949 – 10953 p.
- [9] Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. Anal. Biochem., 72, 248 p.
- [10] Briganti, F., Pierattelli, A., Scozzafava, A. and Supuran, C. T., Eur. J. 1996, Med. Chem., 31, 1001 p.
- [11] Burits, M., Bucar, F., 2000, Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil.
- [12] Champe, P.C. ve Harvey, R.A., 1997, Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri, 438 s.
- [13] Common, R. H., 1941, The carbonic anhydrase activity of the hen's oviduct. J. Agric. Sci., 31, 412 p.
- [14] Cuatrecasas, P., 1970, Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrilamide beads. J. Biol. Chem., 245, 3059 p..
- [15] Daveport, H. W., Wilhelmi, A.E., 1941, Renal carbonic anhydrase Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 48, 53.
- [16] Department of Pharmacology, King Faisal University, College of Medicine, PO Box 2114, Dammam 31451, 2008, Saudi Arabia.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- [17] DerMarderosian A., Lawrence L., Beutler J., Grauds C., Tatro DS., Cirigliano, DeSilva D., 2005, Natural Products, 4th Review EDN pearls. , Facts and comparison. Lipincott Williams & Wilkins).
- [18] Dikmen, N. ve Özgünen, T., 2004, Harper Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri, 928 s.
- [19] El-Dakhakhny M., Mady N., Lembert N., Ammon HP. 2002, The hypoglycemic effect of *Nigella sativa* oil is mediated by extrapancreatic actions. *Planta Med.* May;68(5):465-6.
- [20] El-Mahmoudy A., Shimizu Y., Shiina T., Matsuyama .H, El-Sayed M., Takewaki T. 2005, Successful abrogation by thymoquinone against induction of diabetes mellitus with streptozotocin via nitric oxide inhibitory mechanism. *Int Immunopharmacol.* Jan;5(1):195-207.
- [21] Fararh KM., Ibrahim AK., Elsonosy YA. 2009, Thymoquinone enhances the activities of enzymes related to energy metabolism in peripheral leukocytes of diabetic rats. *Res Vet Sci.* 19. [Epub ahead of print]
- [22] Fararh KM., Shimizu Y., Shiina T., Nikami H., Ghanem MM., Takewaki T. 2005, Thymoquinone reduces hepatic glucose production in diabetic hamsters. *Res Vet Sci.* Dec;79(3):219-23.
- [23] Fukuzawa, H.,Fujiwara , S Yamamoto, Y.,Dionisio-Sese, M. L and Miyachi, S ,1990 cDNA cloning sequence and expression of carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*:regulation by environmental CO₂ concentration .*Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 87:4383-4387
- [24] Ghosheh OA., Houde AA., Crooks PA., 1999, of black seed oil of the pharmacologically active quinones and related compounds by high performance liquid chromatographic analysis (*Nigella sativa*).
- [25] Gilbert, H.F., 1992, Basic Concepts in Biochemistry. Mc Graw-Hill Inc., 81.
- [26] Harper, H., 1975, Enzymes. Review of physiological chemistry. Californiyalos Altos 15thEdition. P 126-172.
- [27] Hazen, S. A., Waheed, A., Sly, W. S., LaNoue, K.F. and Lynch, C.J., 1996, Differentiation – dependent expression of CA and the role of carbonic anhydrase isozymes in pyruvate carboxylation in adipocytes. *FASEBJ*, 10, 481-490 p.
- [28] Hewett-Emmett, D. and Tashian, R,E, 1996, Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of α , β and γ carbonic anhydrase gene families . *Mol. Phylogenet.Evol.* 5:50-77
- [29] İnan, Y. ve Gül, M., 2001, Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., 447 s.
- [30] James B., 1993, Blood flow in the pathogenesis of glaucoma. *Current opinion in ophthalmology*, 4:65-72.
- [31] Kamo, T.,Shimogawara, K., Fukuzawa, H.,Muto, S. and Miyachi, S. 1990 Subunit constitution of carbonic anhydrase from *Chlamydomonas reinhardtii* E:ur. *J Biochem.* 192:557-562
- [32] Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, Ö. İ., 2004, Biyokimya, Aktif Yayınevi, 642 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- [33] Kohn, J. and Wilchek, M. A., 1978, Colormetric method for monitoring activation of sepharose by cyanogen bromide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 7, 14 p.
- [34] Laemmli, D. K., 1970, Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, 227, 680 p.
- [35] Lakkis, M. M., Bergenheim, N. C. H. and Tashian, R. E., 1996, Expression of carbonic anhydrase of mouse VII. in *E. Coli*. And demonstration of its CO₂ hydrase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 226, 268-272 p.
- [36] Landolfi, C., Marchetti, M., Ciocci, G. and Milanese, C., 1998, Development and pharmacological characterization of a modified procedure for the measurement of carbonic anhydrase activity *J. Pharm. And. Toxicol. Meth.*, 38, 169-172p.
- [37] Lesburg, C. A. and Christianson, D. W., 1995, X – ray crystallographic studies of engineered hydrogen bond Networks in a protein – zinc binding site. *J. Am. Soc.*, 117 6368-6844 p.
- [38] Lindskog, S., 1997, Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase. *Pharma col. Ther.* 74, 1-20 p.
- [39] Maren, C. H., 1960, A simplified micromethod for the determination of carbonic anhydrase and its inhibitors. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 130, 26 p.
- [40] Maren, T. H. and Conroy, C. W., 1993, A new class of carbonic anhydrase inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 268, 26233-26239 p.
- [41] Maren, T. H., 1967, Carbonic Anhydrase; chemistry, physiology and inhibition. *Physiol. Rev.*, 47, 595 p.
- [42] Pocker, Y. and Janjic, N., 1989, Molecularity of Water in Enzymic Catalysis. Application to Carbonic anhydrase II, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 731 p., 1989.
- [43] Pocker, Y., and Sarkanen, S., 1979, Carbonic anhydrase: Structure, Catalytic Versatility and inhibition, *Advances in Enzymology*, Interscience, New York, 49, 149.
- [44] Rchid H., Chevassus H., Nmila R., Guiral C., Petit P., Chokairi M., Sauvaire Y., 2004, *Nigella sativa* seed extracts enhance glucose-induced insulin release from rat-isolated Langerhans islets. *Fundamental & Clinical Pharmacology*; 18(5):525-529
- [45] Renzi, G., Scozzafava, A. and Supuran, C. T., 2000, Carbonic anhydrase Inhibitors: Topical Sulfonamide Antiglaucoma Agents Incorporating Secondary Amine Moieties. *Bioorg. Med. Chem., Italy*, 10, 673-676 p.
- [46] Scher, A. and Dietsch, P., 1984, A 54 000 molecular weight protein with carbonic anhydrase activity in rabbit erythrocytes. In *Biology and Chemistry of the carbonic anhydrase*. *Annals New York Acad. Sci.*, 429, 241.
- [47] Sly, W.S. and Hu, P.Y., 1995, Human carbonic anhydrase and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu. Rev. Biochem*, 67, 375-401 p.
- [48] Sly, W.S. and Hu, P.Y., 1995, Human carbonic anhydrase and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu. Rev. Biochem*, 64, 375-401 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- [49] Stams, T., Chen, Y., Boriack – Sjodin, P. A., Hurt, J. D., Liao, J., May, J. A., Dean, T., Laipis. P. and Christianson, D. W., 1998, Protein Sci., 7, 556 p.
- [50] Supuran, C. T. and Scozzafava, A., 2001, Carbonic Anhydrase Inhibitors, Curr. Med. Chem., Italy, 1, 61-97 p.
- [51] Supuran, C.T and Scozzafava, A., 2001, Carbonic Anhydrase Inhibitors. Curr. Med.Chem., 1, 61- 97, Italy.
- [52] Telefoncu, A., 1986, Temel ve Uygulamalı Enzimoloji. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayını, İzmir, 59.
- [53] Temizkan, G. ve Arda, N. 2004, Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. Nobel Tıp Kitapevleri.
- [54] Van Slyke, D. O. and Hawkins, J. A., 1930, Studies of gas and electrolyte equilibria in blood. XVI. The evalutaion of carbon dioxide from blood and buffer solutions. J. Biol. Chem., 80, 265 p.
- [55] Verpoorte, J. A., Mehta, S. And Edsall, J. T., 1967, Esterease activities of human carbonic anhydrase. J. Biol. Chem., 242, 4221 p.
- [56] Zedlitz S., Kaufmann R., Boehncke WH., 2002, Allergic contact dermatitis from black cumin (*Nigella sativa*) oil-containing ointment. Contact Dermatitis 46, 188.