

MANTAR BİLEŞENLERİNİN KARBONİK ANHİDRAZ İNHİBİTÖRÜ  
OLARAK İNSAN KARBONİK  
ANHİDRAZ ENZİMLERİ ÜZERİNDE İNHİBİSYON  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Rabia AKKAŞ

Yüksek Lisans

Kimya Anabilim Dalı

Mayıs-2010

MANTAR BİLEŞENLERİNİN  
KARBONİK ANHİDRAZ İNHİBİTÖRÜ OLARAK İNSAN KARBONİK  
ANHİDRAZ ENZİMLERİ ÜZERİNDE İNHİBİSYON  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Rabia AKKAŞ

Dumlupınar Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca  
Kimya Anabilim Dalında  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. Metin BÜLBÜL

Mayıs-2010

**KABUL VE ONAY SAYFASI**

Rabia AKKAŞ'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Mantar Bileşenlerinin Karbonik Anhidraz İnhibitörü Olarak İnsan Karbonik Anhidraz Enzimi Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

/ 05 / 2010

**İmza:**

Üye : Doç. Dr. Metin BÜLBÜL  
Üye : Yrd. Doç. Dr. Nurgün BÜYÜKKIDAN  
Üye : Yrd. Doç. Dr. Azmi YERLİKAYA

Fen Bilimleri Enstitüsünün Yönetim Kurulu'nun ... / ... / 2010 gün ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Atalay KÜÇÜKBURSA

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## **MANTAR BİLEŞENLERİNİN İNSAN KARBONİKANHİDRAZ ENZİMLERİ ÜZERİNDE İNHİBİSYON ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Rabia AKKAŞ

Kimya, Yüksek Lisans Tezi,

2010 Tez Danışmanı: Doç. Dr. Metin BÜLBÜL

### **ÖZET**

Karbonik anhidraz (EC.4.2.1.1), ilk defa memelilerin eritrositlerinden saflaştırılan, çinko iyonlu bir metaloenzimdir. Karbonik anhidraz  $\text{CO}_2$ 'in,  $\text{HCO}_3^-$  ve  $\text{H}^+$  iyonlarına iki basamakta dönüşümlü hidrasyonunu katalizler. İnsan gözünde CA-II ve CA-IV izoenzimleri bulunur. Karbonik anhidraz inhibitörleri, aköz humorun salgılanmasıyla oluşan yüksek göz içi basıncını (IOP) düşürdükleri için, glokom hastalığının tedavisinde etkili olarak kullanılırlar.

Yapılan araştırmalarda mantarların kan şekeri ve kolesterolü düşürücü, antioksidan, antitümör ve göz hastalıklarını tedavi edici etkiye sahip olduğu görülmüştür. Çalışmamızda en çok kullanılan tıbbi mantarların önemli bileşenleri olan beta D- gluklan, lektin, linoleik asit ve beta karotenin karbonik anhidraz enzimi üzerinde inhibisyon etkileri incelenmiştir.

Önce insan eritrositlerinden karbonik anhidraz enzimleri afinite jeli kullanılarak (Sephrose-4B-L-tirozin-sülfonilamid) saflaştırılmış ve daha sonra bu enzimlerle kinetik çalışmalar yapılmıştır. Temin edilen beta D- gluklan, lektin, linoleik asit ve beta karotenin insan eritrosit HCA I ve HCA II enzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi incelenmiştir. Çalışmalarda karbonik anhidraz aktivitesinin belirlenmesinde hidrataz ve esteraz aktivitelerinden faydalanılmıştır. HCA'nın esteraz aktivitesi üzerinde lektin, linoleik asit ve beta karoten bileşiklerinin inhibisyon etkisi, beta D- gluklanın ise aktivasyon etkisi belirlenmiştir. İnhibisyon etkisi gösteren maddeler için % aktivite-[I] grafikleri çizilerek  $I_{50}$  değerleri bulunmuştur.  $\text{CO}_2$ -Hidrataz aktivitesine göre inhibisyon gösteren lektin ve linoleik asit bileşiklerinin  $I_{50}$  değerleri; HCA I için 2,41 ve 2,3  $\mu\text{M}$  ve HCA II için 2,52 ve 1,48  $\mu\text{M}$  arasında bulundu. Esteraz aktivitesine göre ise; HCA I için 4,9, 0,17 ve 1,45  $\mu\text{M}$  ile HCA II için 2,7, 1,2 ve 0,92  $\mu\text{M}$   $I_{50}$  değerleri bulundu.

**Anahtar Kelimeler:** Glokom, Karbonik Anhidraz İnhibitörleri, (Beta D-Glukan, Lektin, Linoleik Asit, Beta Karoten ), Mantar.

## THE INVESTIGATION OF THE CARBONIC ANHYDRASE INHIBITION EFFECTS OF MUSHROOM COMPONENTS ON HUMAN CARBONIC ANHYDRASE ENZYME

Rabia AKKAŞ

Chemistry, M. S. Thesis, 2010

Thesis Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

### SUMMARY

Carbonic anhydrases (E.C. 4.2.1.1.) are family of zinc metalloenzymes that first purified from mamalian erythrocyte. Carbonic anhydrases catalyze the reversible hydration of carbon dioxide in a two-step reaction to yield bicarbonate and proton. The isoenzymes of human eye are CAII and CA-IV. Carbonic anhydrase inhibitors, which reduce aqueous production with a corresponding decrease in intraocular pressure (IOP), have been used as ocular hypotensive agents for the treatment of glaucoma.

In a study of fungies have effect reduce blood sugar and cholestrol, antioxidant, the treating eye diseases, antitumor. We studied the inhibition effect of medicinal mushrooms, beta-D-glucan, lectin, linoleic acid and beta carotene on the carbonic anhydrase.

Before, carbonic anhydrase enzymes from human erythrocyte were purified using affinity gel and all of the investigations were carried out with these enzymes. Later, the obtained beta D-glucan, lectin, linoleic acid and beta carotene on the inhibition effect on human erythrocyte HCA I and HCA II enzymes were studied. In these studies, it was taken advantage of hydrates and esterase activites for determining of carbonic anhydrase activitates. HCA on esterase activity, lectin, linoleic acid, and beta carotene compounds showed inhibitory effect on the activation effect of beta D- glucan was determined.  $I_{50}$  values were determined by drawing % activity-[I] graphs for drugs showing inhibition effects. For  $\text{CO}_2$ -hydratase activity of compound lectin to Linoleic acid inhibition effect ranged from 2,41 to 2,3  $\mu\text{M}$  for HCA I and 2,52 to 1,48  $\mu\text{M}$  with  $I_{50}$  for HCA II. As for esterase activity of, compounds lectin, linoleic acid to beta carotene had inhibition ranged from 4,9, 0,17 to 1,45  $\mu\text{M}$  for HCA I and 2,7, 1,2 to 0 92  $\mu\text{M}$  for HCA II with  $I_{50}$ .

**Key Words:** Glaucoma, Carbonic Anhydrase Inhibitors, (Beta D- Glucan, lectin, linoleic acid, beta carotene), mushroom.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında bana bu çalışma olanağını sağlayan Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof.Dr.Yunus ERDOĞAN’a, bu tez çalışmasının planlanması ve yürütülmesi süresince desteğini ve ilgisini esirgemeyen, danışman hocam Sayın Doç.Dr.Metin BÜLBÜL’e, teşekkürü bir borç bilirim.

Beni yüksek lisans yapmaya sevk eden, gayretlendiren ve bu konu da anlayışlarını esirgemeyen Sayın Prof.Dr. Ali SARIKOYUNCU, Sayın Prof.Dr. Ali TORUN ve Sayın Yalçın KALAY’a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamda yardımcı olan yüksek lisans arkadaşlarım Burcu ÇINAR, Hülya ÇELİK ve mesai arkadaşım Fatma EKİCİ’ye, ilgilerinden dolayı Kimya Bölümü değerli öğretim elemanlarına teşekkür ediyorum.

Hayatım boyunca yanımda olan ve desteklerini hiç esirgemeyen sevgili aileme minnettarım.

Saygılarımla.

Rabia AKKAŞ

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                 | <u>Sayfa</u> |
|---------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| KABUL VE ONAY SAYFASI.....                                                      | iii          |
| SUMMARY.....                                                                    | v            |
| TEŞEKKÜR.....                                                                   | vi           |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                                            | ix           |
| ÇİZELGELER DİZİNİ.....                                                          | xi           |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....                                             | xii          |
| 1.GİRİŞ.....                                                                    | 1            |
| 1.1. Ganoderma Lucidum.....                                                     | 4            |
| 1.2.Lentinula Edodes (Shiitake) Meşe Mantarı.....                               | 5            |
| 1.3. Maitake (Grifola frondosa).....                                            | 6            |
| 1.4. Beta D- Glukan (Lentinan).....                                             | 7            |
| 1.4.1.Glukanın İşlevleri.....                                                   | 8            |
| 1.5. Lektin.....                                                                | 9            |
| 1.6. Linoleik Asit.....                                                         | 11           |
| 1.7. Beta Karoten.....                                                          | 12           |
| 1.7.1. Beta Karoten ve Kanser.....                                              | 13           |
| 1.7.2.Beta Karotenin Faydaları.....                                             | 14           |
| 1.8. ENZİMLER.....                                                              | 14           |
| 1.9. KARBONİK ANHİDRAZ.....                                                     | 15           |
| 1.9.1. Dağılımı ve Fizyolojik Önemi.....                                        | 15           |
| 1.9.2. Fiziksel, Kimyasal ve Kinetik Özellikleri.....                           | 16           |
| 1.9.3.Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması.....                    | 17           |
| 1.9.4.Karbonik Anhidraz Aktivitesi.....                                         | 18           |
| 1.9.5.Karbonik Anhidraz İnhibitörleri.....                                      | 19           |
| 1.9.6.Göz bozukluklari için ilaçlar olarak karbonik anhidraz inhibitörleri..... | 20           |

## İÇİNDEKİLER (devamı)

|                                                                                                                                                                            | <u>Sayfa</u> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 2. MATERYAL VE YÖNTEM.....                                                                                                                                                 | 22           |
| 2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....                                                                                                                                     | 22           |
| 2.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar.....                                                                                                                                    | 22           |
| 2.5 Yöntemler.....                                                                                                                                                         | 24           |
| 2.5.1 Protein tayini.....                                                                                                                                                  | 24           |
| 2.5.2. Kalitatif protein tayini.....                                                                                                                                       | 24           |
| 2.5.3. Bradford (coomassie blue) yöntemi ile protein tayini.....                                                                                                           | 24           |
| 2.5.4. Karbonik anhidraz aktivitesi tayini.....                                                                                                                            | 24           |
| 2.5.4.1. CO <sub>2</sub> -Hidrataz aktivitesi tayini.....                                                                                                                  | 24           |
| 2.5.4.2. Esteraz aktivitesi tayini.....                                                                                                                                    | 25           |
| 2.5.5. İnsan eritrositlerinden karbonik anhidraz enzimlerinin saflaştırılması.....                                                                                         | 26           |
| 2.5.5.1. Sepharose - 4B matriksi üzerinde afinite jelinin hazırlanışı.....                                                                                                 | 26           |
| 2. 6. Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit CA I Ve CA II Enzimleri Üzerindeki İnhibitör Etkilerinin İncelenmesi.....                                                   | 26           |
| 2. 6. 1. Sentezlenen bileşiklerin İnsan Eritrosit CA I Ve CA II enzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkilerinin <i>in vitro</i> olarak incelenmesi..... | 26           |
| 2. 6. 2. Sentezlenen bileşiklerin CA I Ve CA II enzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisinin <i>in vitro</i> olarak incelenmesi.....                      | 26           |
| 2. 6. 3. Sentezlenen bileşiklerin CA I ve CA II enzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkilerinin K <sub>i</sub> sabitleriyle bulunması.....               | 27           |
| 3. ARAŞTIRMA BULGULARI.....                                                                                                                                                | 28           |
| 3. 1. CA Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması Sonuçları.....                                                                                               | 28           |
| 3. 2. Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit CA Enzimleri Üzerinde İnhibisyon Etkilerinin <i>in vitro</i> Olarak İncelenmesi.....                                        | 29           |
| 3. 2. 1 Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA enziminin hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkilerinin <i>in vitro</i> olarak incelenmesi.....                | 29           |
| 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....                                                                                                                                               | 48           |
| KAYNAKLAR DİZİNİ.....                                                                                                                                                      | 51           |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Şekil</u> |                                                                                                         | <u>Sayfa</u> |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 1            | Beta 1,3-1,6 glukon.....                                                                                | 7            |
| 2            | Lentinan (1 6): (1 3)-β-D-glukan.....                                                                   | 8            |
| 3            | Lektinin yapısı.....                                                                                    | 10           |
| 4            | Linoleik asitin yapısı.....                                                                             | 11           |
| 5            | Beta karotenin yapısı.....                                                                              | 12           |
| 6            | İnsan CA II'deki metal merkezin “doğrudan” ve “dolaylı” ligandları gösteren şematik görünümü.....       | 17           |
| 7            | Karbonik anhidrazın katalizlediği CO <sub>2</sub> - hidrataz reaksiyonu mekanizmasının gösterilişi..... | 18           |
| 8            | Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılan standart grafik.....                                 | 29           |
| 9            | İnsan Eritrosit CA I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine glukon bileşiğinin etkisi.....               | 30           |
| 10           | İnsan Eritrosit CA I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine lektin bileşiğinin etkisi.....               | 31           |
| 11           | İnsan Eritrosit CA I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine linoleik asit bileşiğinin etkisi.....        | 32           |
| 12           | İnsan Eritrosit CA I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine beta karoten bileşiğinin etkisi.....         | 32           |
| 13           | İnsan Eritrosit CA II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine glukon bileşiğinin etkisi.....              | 33           |
| 14           | İnsan Eritrosit CA II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine lektin bileşiğinin etkisi.....              | 34           |
| 15           | İnsan Eritrosit CA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine glukon bileşiğinin etkisi.....                | 35           |
| 16           | İnsan Eritrosit CA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine lektin bileşiğinin etkisi.....                | 36           |
| 17           | İnsan Eritrosit CA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine glukon bileşiğinin etkisi.....                | 37           |
| 18           | İnsan Eritrosit CA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine linoleik asit bileşiğinin etkisi.....         | 38           |

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devamı)

| <b><u>Sekil</u></b> |                                                                                                               | <b><u>Sayfa</u></b> |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 19                  | İnsan Eritrosit CA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine beta karoten bileşiğinin etkisi.....                | 38                  |
| 20                  | İnsan Eritrosit CA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine glukon bileşiğinin etkisi.....                     | 39                  |
| 21                  | İnsan Eritrosit CA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine lektin bileşiğinin etkisi.....                     | 40                  |
| 22                  | İnsan Eritrosit CA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine linoleik asit bileşiğinin etkisi.....              | 40                  |
| 23                  | İnsan Eritrosit CA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine beta karoten bileşiğinin etkisi.....               | 41                  |
| 24                  | Bileşiklerin CA I ve CA II enzimlerinin in vitro esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları..... | 42                  |
| 25                  | İnsan Eritrosit CA I enzimi üzerinde Lektin bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği.....                          | 44                  |
| 26                  | İnsan Eritrosit CA II enzimi üzerinde Lektin bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği.....                         | 44                  |
| 27                  | İnsan Eritrosit CA I enzimi üzerinde Linoleik Asit bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği.....                   | 45                  |
| 28                  | İnsan Eritrosit CA II enzimi üzerinde Linoleik Asit bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği.....                  | 45                  |
| 29                  | İnsan Eritrosit CA I enzimi üzerinde Beta Karoten bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği.....                    | 46                  |
| 30                  | İnsan Eritrosit CA II enzimi üzerinde Beta Karoten bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği.....                   | 46                  |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

| <u>Çizelge</u> |                                                                                                                                                                                                      | <u>Sayfa</u> |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 1              | 100 gr mantardaki besin değerleri.....                                                                                                                                                               | 1            |
| 2              | Mantarlardaki mineral miktarı.....                                                                                                                                                                   | 2            |
| 3              | HCA-I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine Glukan, Lektin, Linoleik Asit, Beta Karoten bileşiklerinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.....  | 30           |
| 4              | HCA-II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine Glukan, Lektin, Linoleik Asit, Beta Karoten bileşiklerinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar..... | 33           |
| 5              | HCA-I enziminin esteraz aktivitesi üzerine Glukan, Lektin, Linoleik Asit, Beta Karoten bileşiklerinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.....   | 36           |
| 6              | HCA-II enziminin esteraz aktivitesi üzerine Glukan, Lektin, Linoleik Asit, Beta Karoten bileşiklerinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.....  | 39           |
| 7              | Bileşiklerin CA I ve CA II enzimlerinin in vitro CO <sub>2</sub> -hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları.....                                                                      | 42           |
| 8              | Bileşiklerin CA I ve CA II enzimlerinin in vitro esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları.....                                                                                        | 42           |
| 9              | Bileşiklerin eritrosit CA I enziminin esteraz aktivitesi üzerinde yapılan in vitro inhibisyon çalışmaları toplu sonuçları.....                                                                       | 47           |
| 10             | Sentezlenen bileşiklerin eritrosit CA II enziminin esteraz aktivitesi üzerinde yapılan in vitro inhibisyon çalışmaları toplu sonuçları.....                                                          | 47           |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

|         |            |
|---------|------------|
| L       | Litre      |
| mL      | Mililitre  |
| $\mu$ L | Mikrolitre |
| $\mu$ g | Mikrogram  |
| $\mu$ M | Mikromolar |
| nM      | Nanomolar  |

### Açıklama

### Kısaltmalar

|      |                                               |
|------|-----------------------------------------------|
| CA   | Karbonik anhidraz enzimi                      |
| CARP | Protein bağlı karbonik anhidraz               |
| E. C | Enzim kod numarası                            |
| E. U | Enzim ünitesi                                 |
| EDTA | Etilendiamintetraasetikasit                   |
| IOP  | Yüksek göz içi basıncı (Intraocular pressure) |
| Tris | Trihidroksimetilaminometan                    |

### Açıklama

## 1. GİRİŞ

Eski zamanlardan beri mantarlar günlük beslenmenin yanı sıra, güzel aromaları ve tatları ile insanlar tarafından tüketilmektedir. Ayrıca mantarların tedavi edici amaçla kullanımı da günden güne artmaktadır. Doğal ürünler arasında yer alan mantarlar klinik çalışmalarda da sıkça kullanılmaktadır [1].

Mantarları Whittaker'in 1969'da önerdiği 5'li sisteme kadar bitkiler alemi içinde ve tohumlu bitkiler ile beraber bir bölüm (Mycophyta) olarak ele alınmaktadır. Whittaker ise kendi düşüncesini geliştirirken; yüz yirmi beş bin civarında bir tür çeşitliliği gösteren tüm mantarların, ayrı bir canlılar alemi oluşturduğunu kabul edip Regnum: Myceteae (Fungi) adını verdiği aleme yerleştirmiştir [2,3]. Aynı zamanda mantarlar, çok hücreli ve tek hücreli olabilen ökaryotik bir canlı alemdir.

Mantar ismi şapkalı mantarların tümüne halk arasında verilen genel bir isimdir. Halk arasında küf, pas, rastık, maya, şapkalı mantar gibi çeşitli isimlerle anılan bütün mantarlar, mantarlar alemi içerisinde incelenirler. Dünyanın her yerinde bulunurlar. Nemli yerlerde daha çok görülmektedirler. Yeryüzünde 1,5 milyon kadar mantar türü olduğu düşünülmekte günümüzde sadece 69.000 kadar türü bilinmektedir. Makro mantarlar klorofil içermeyen, üreme organları ve esas bünyeleri iplik gibi, "hif" denilen küçük borucuklardan ibaret canlılardır. Yaşama modelleri ve belirgin şekilleri ile bağımsız canlı alemlerdir. Bu canlılar hem eşeyli hem de eşeysiz olarak, sporlar oluşturarak ürerler.

| %             | Su | Protein | Yağ | Karbonhidrat | Mineraller | Kalori |
|---------------|----|---------|-----|--------------|------------|--------|
| <b>MANTAR</b> | 92 | 3.5     | 0.3 | 4.5          | 1.0        | 25     |

**Çizelge 1.** 100 gr mantardaki besin değerleri.

Klorofil içermediklerinden bağımsız olarak şeker, yağ ve nişasta gibi organik maddeler oluşturamazlar ve bu nedenle diğer canlılara ihtiyaç duyarlar. Makromantarlar; çayırlarda, yol kenarlarında, ormanlarda, ağaç altlarında yetişirler. Çok değişik renk ve şekillere sahiptirler. Yenilebilir mantarlar, yukardaki tabloda da görüldüğü gibi % 92 ölçüde su içermekte ve aroması nedeniyle bazı insanlar tarafından büyük ilgi görmektedir.

| Mineral Madde | Miktarı (mg) | Mineral Madde | Miktarı (mg) |
|---------------|--------------|---------------|--------------|
| Kalsiyum      | 25           | Bakır         | 80           |
| Fosfor        | 130          | Klor          | 20           |
| Potasyum      | 400          | Sodyum        | 0.28         |
| Demir         | 1            | Çinko         | 0.6          |
| Mangan        | 0.65         | Brom          | 0.2          |

**Çizelge 2.**Mantarlardaki mineral miktarı

Protein ve mineral tuzlar açısından oldukça zengin yapıdadırlar. Kalsiyum, potasyum, fosfor ve demir içerirler. Mantarlar C vitamini açısından fakirdirler. Buna karşılık, B grubu vitaminleri, K ve D<sub>2</sub> vitaminleri açısından zengin mantar türleri de vardır.

Mantar proteinlerinin sindirilme yüzdeleri % 72 – 83 arasındadır. Meyve ve sebzelerle kıyaslandığında, iyi bir lizin, arginin, histidin ve treonin kaynağıdırlar. İnsan beslenmesi için gerekli tüm aminoasitleri içermekte olup, buna rağmen triptofan seviyeleri kısmen düşüktür. Ayrıca mantarlar sodyum, klor, bakır, demir, potasyum, brom, mangan, çinko, fosfor, kalsiyum, riboflavin, nikotinik asit gibi mineral ve vitaminler açısından da zengindirler [4]. Mantarlar mükemmel bir folik asit kaynağıdırlar. Folik asit yetersizliğinden ileri gelen aneminin tedavisinde mantar içeren diyetler etkili olmaktadır. Mantarlarda yapılan araştırmalar sonucunda mantarların kandaki şeker seviyesini ve kolesterolü de düşürdüğü görülmektedir [5].

Medikal mantarların ortaya çıkış tarihi geleneksel doğu terapilerine kadar uzanmakta olup doğu kültüründe uzun yıllardır çay ve besleyici gıda olarak kullanılmaktadır. Bunun başlıca nedeni kendilerine has kokuları ve yumuşak yapılarıdır [6]. Modern klinik uygulamalarında Japonya, Çin, Kore ve diğer Asya ülkelerinde kurutulmuş mantar materyallerine günümüzde de rastlanmaktadır. Tatlı ve besleyici bir gıda olarak değerlendirilen birçok yabani mantar türü, dünya genelinde farklı milletler tarafından düzenli olarak toplanır ve sonra direkt olarak ana besin kaynağı olarak kullanılır ya da yemeğe katılır.

Antik Romalılara göre; mantarlar tanrıların yiyecekleriydi. Mısırlılar; mantarları tanrı Osiris'ten bir hediye olarak nitelendirirken, Çinliler de; mantarları hayatın iksiri olarak düşünmüşlerdir. Bu kavimler, deneme yanılma yoluyla yenilebilen ve yenilemeyen zehirli mantarlar hakkında bilgi edinmişlerdir [7].

Mantarın tıbbi öneminden ilk olarak bahseden, M.Ö.400- 470 yıllarında yaşamış olan Hipokrat' tır. Birçok ülkede özellikle Çin ve Japonya gibi Uzak Asya ülkelerinde bazı makrofungusların çeşitli hastalıklara karşı halk ilacı olarak kullanıldığı bilinmektedir. Günümüzde ise funguslardan değişik ortamlarda elde edilen maddelerin saflaştırılması ile başlayan çalışmalar neticesinde fungusların *bağışıklığı güçlendirici, hipoglisemik, hipolipidemik, karaciğeri koruyucu ve antimikrobiyal* etki mekanizmalarının, *immunostimulant* ve benzer biyolojik ve farmakolojik özellikleri nedeni ile araştırılmaya başlanmış ayrıca kimya ve kozmetik endüstrisinde de boy göstermeye başlamıştır. *Terfezia* sp. (keme) mantarının özünün gözün iltihabi hastalıkları için kullanıldıkları bilinmektedir. Çinliler *Agaricus bisporus* (Kültür Mantarı)'u sindirim bozukluklarının tedavisinde kullanılmışlardır. Ayrıca antitümöral etkileri olan birçok mantarın üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Meksika gibi bazı Orta ve Güney Amerika ülkelerinde ise bazı makrofungusların heykelleri yapılmıştır. Hatta yine bu ülkelerde *Panaeolus* sp. ve *Psilocybe* sp. cinsine ait türler içerdikleri psilosibin ve psilosin maddelerinin LSD (D-Liserjik Asid Dietilamid)'ye benzer bir etki göstermelerinden dolayı tarih boyunca keyif verici olarak ve bazı dini törenlerde kullanılmışlardır.

1200'lü yıllarda mantar suyunun mikrobik göz hastalıklarını tedavi ettiği de belirtilmiştir. Mantar suyunun kirpikleri kuvvetlendirdiği, gözün görme duyusunu güçlendirdiği, göz hararetine iyi geldiği, göz nezlesini giderdiği ve göz iltihabında iyi geldiği bilinmektedir.

Birçok fungusun biyoaktif bileşenlerinin incelenmesinde epeyce yol alınmıştır. Örneğin, *Wolfiporia* sp. fungusu genel bir yatıştırıcı olarak merkezi sinir sistemine etki ederek kalp çarpıntılarının kontrolünde kullanılır. Klinik çalışmalarda bu mantardan elde edilen bileşikler farelerde stresin neden olduğu ülserle karşı koruma sağlamıştır. Mantar idrar söktürücü ve deri iltihaplarını önleyici olarak da kullanılmaktadır. Çinliler mantarı meme ve rahim kanserlerini tedavi etmek için kullanmaktadır [8].

Funguslardan da birçok ilaç ve *penisilin, griseofulvin gibi antibiyotikler, ergot alkaloidi ve cyclosporin* elde edilmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda ise fungusların ve onlardan elde edilen metabolitlerin insan bağışıklık sistemi ile ilgili hastalıklarda pozitif sonuçlar verdikleri görülmüştür. Bugünlerde yapılan çalışmalarda ise fungusların kanser, AIDS (HIV), hepatit ve bağışıklık sistemi hastalıklarına karşı etkileri araştırılmaktadır.

Mantarların tıbbi özellikleri arasında; antimikrobiyal etkileri, antioksidan etkileri, hepatoprotektif etkileri ( karaciğer koruyucu etkileri ), antidiyabetik etkileri, bağışıklık sistemini

düzenleyici özelliği, antitümör etkileri, kolesterol düşürücü özelliği, şeker düşürücü özelliği bulunmaktadır.

En önemli tıbbi mantarlar ve bu mantarların insan sağlığına etkileri

1. *Ganoderma lucidum*, *Ling Zhi*, *Reishi* (Ölümsüzlük Mantarı)
2. *Lentinula edodes* (*shiitake*) Meşe Mantarı
3. *Maitake* (*Grifola frondosa*)



*Ganoderma Lucidium* (reishi)



*Lentinula Edodes* (shiitake)



*Grifola Frondosa* (maiteka)



*Pleurotus Ostreatus*

### 1.1. *Ganoderma Lucidum*:

Son zamanlarda klinik yönden oldukça ilgi çeken bu mantarın belli bir tedavi edici dozu kalp hastalıklarını kontrol etmek için kullanılmaktadır. Deneysel çalışmalarda mantarın

hipolipidemik bir madde içerdiği ve serum kolesterolünü düşürdüğü ortaya çıkmıştır [8]. Ganoderonlar olarak adlandırılan glikopeptid bileşikleri kan şekerini düşürdüğünü ve mantarın antidiyabetik olarak kullanılabileceğini ortaya koymaktadır. Mantarın ayrıca radyasyon zararlarına karşı koruyucu etkisi vardır. Mantarların klinik testlerde tümör büyümesini önleyen karbonhidratlar içerdiği de tespit edilmiştir [9]. Hipertansiyon, kronik bronşiyal astım, duodenal ülser gibi birçok hastalık için tedavi edici olarak kullanılmaktadır [7].

*G. lucidum*'un biyolojik etki spektrumundaki genişlik yapısında bulunan alkoloidler, aminoasitler, peptitler, inorganik elementler, steroidler, yağ asitleri ve organik asitlerin çeşitliliğine bağlanabilir. En önemli bileşenleri, önemli farmakolojik etkiler göstermelerinden dolayı, triterpenler ve polisakkaritlerdir [10]. En bilinen polisakkarit de beta D-glukandır.

- Vücudun toksinlerden ve fazla yağlardan arındırılmasına kullanılır.
- Vücudun bağışıklık sistemini düzeltir.
- Solunum yolları problemlerinin çözücüsü olarak tanınır. Karaciğer bozukluklarına, hipertansiyona iyi gelir.
- Antialerjik, antibakterial ve antioksidan (yaşlanmayı geciktirici) etkilidir.
- Kalp damar rahatsızlıklarına, mideye, uykusuzluğa, baş dönmesine, öksürüğe, iştahsızlığa, strese iyi gelir.
- Güzellik ajanı olarak kullanılır. Aknelerin ve diğer cilt problemlerinin giderilmesine, kırışıkların giderilmesine ve cilt lekelerinin açılmasına iyi gelir.
- Şekeri ve astımı tedavi edicidir.
- Saç dökülmelerinin önlenmesinde,
- Kan akışını kolaylaştırarak, kalbin kan basıncının azaltılmasına,
- Osteoporoz gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır.
- Mantardan elde edilen kompleks bir glikoprotein, antibadilerin üretimini artırarak kansere karşı etkili olur (mide, yemek borusu ve akciğer kanserleri).

### **1.2.Lentinula Edodes (Shiitake) Meşe Mantarı:**

Çin başta olmak üzere Japonya, Orta Doğu, Asya, Avrupa ve Amerika'da üretimi hızla yaygınlaşan *L. edodes* taze ve kurutulularak tüketilmektedir.

Bilimsel olarak yapılan çok sayıda araştırmada shiitakenin kan dolaşımını düzenlemesi, beyin kanamalarının, damar sertliğinin, böbrek yetmezliğinin, yüksek tansiyonun önlenmesinde etkili olduğu, antibakteriyal, antiviral özelliklerinin yanında ayrıca romatizma, soğuk algınlığı,

mide ve baş ağrısını, hepatit B hastalığını tedavi ettiği, halsizliği ortadan kaldırarak uykusuzluğu giderdiği, bağışıklık sistemini güçlendirdiği bildirilmektedir.

Bazı önemli bileşenleri, biyoaktif polisakkarit (lentinan), eritadenin, vitamin D, B2, B12, yağ asitleri ve minerallerdir. Shiitake mantarlarının bileşenlerinin, bazı sağlık problemlerinde tedavi amaçlı kullanıldığı bilinmektedir. Birincil bileşeni kolesterolü düşüren eritadenindir. Eritadenin, kolesterolün düşürülmesini hızlandırmaktadır. [11]. Bu mantarların suda çözünebilir lifli kısımlarından hem homojen hem de heterojen polisakkaritler/glukan ve glukoprotein kompleksleri izole edilmiştir [12]. Suda çözünebilir homojen polisakkariti ( $\beta$ -glukan) lentinandır [13].

Ayrıca Sarcoma 180 tipi tümörler ve metilkloranten içeren birkaç tip tümöre karşı antitümör aktivitesinin olduğu bilinmektedir [14]. Diğer içerdiği faydalı bileşikler, glukanlar ve glukoprotein kompleksleri bugüne kadar tam olarak belirlenememiştir. Mantarların doğal antibiyotik kaynakları olduğu bilindiğinden dolayı, Shiitake ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri de araştırılmıştır [15]. Shiitake'nin bir diğer bileşeni de miselyumundan ekstrakte edilen LEM (*Lentinula edodes* miselyum ekstraktı)'dir. LEM'in insan hücrelerinde oluşan HIV virüsünü inhibe ettiği, kronik hepatit B'ye karşılık antiviral etkisinin olduğu ve karaciğer fonksiyonlarını düzelttiği kanıtlanmıştır [16].

### 1.3. Maitake (*Grifola frondosa*):

Mantarların kralı veya dans eden mantar olarak adlandırılır. Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika'da ılıman bölge ormanlarında yetişir.

Mantarın antitümör, antikanser ve AIDS'e karşı etkisi klinik çalışmalarla tespit edilmiştir. Maitekenin fraksiyonları akciğer, kolon, karaciğer, prostat, beyin tümörlerinde büyümeyi yavaşlatan bir potansiyel olarak görülüyor.

Günümüze kadar yapılan araştırmalarda, maitake mantarının özellikle T hücrelerini, makrofajları harekete geçirerek vücudun doğal bağışıklığını öne çıkarabilmektedir. Diabet, kolesterol, hipertansiyon, immun sistem uyarıcısı olarak ve kilo kaybına karşı kullanımı önerilmektedir. Etkin maddesi polisakkaritler ve beta D- glukan yani lentinandır.

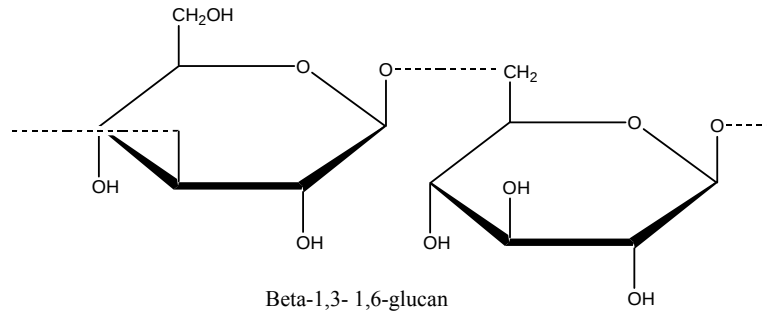
Tıbbi mantarların yapısında bulunan maddelerden bazıları:

1. Beta D- Glukan (Lentinan)
2. Lektin
3. Linoleik Asit
4. Beta Karoten

#### 1.4. Beta D- Glukan (Lentinan):

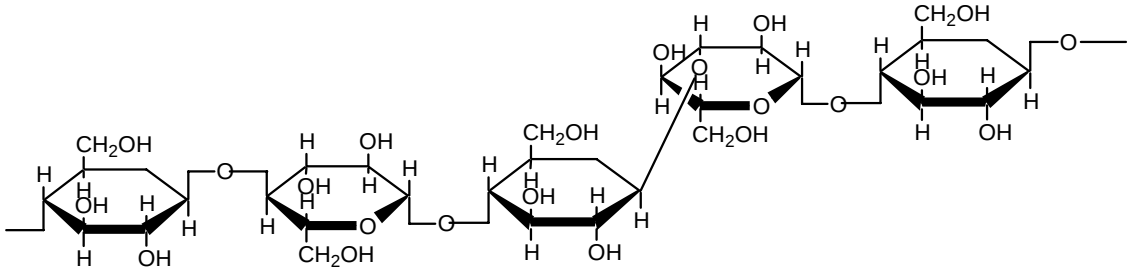
Lentinan, mantarından ekstrakte edilen, suda çözünebilir bir polisakkarittir. Lentinan, antitümör etkisinin olduğu bilinen  $\beta$ -glukandan izole edilmektedir [17].

*Lentinus edodes*'in meyve kısmından ekstrakte edilen  $\alpha$ - ve  $\beta$ -glukanlar'dan (1-6) yan dallanmış üniteleri bulunan  $\beta$ -(1-3)-D-glukan suda çözünürken, ana bileşen olan aynı yan dallanmaya sahip  $\alpha$ -(1-3)-D glukan suda çözünmemektedir.  $\alpha$ -glukanın suda çözünmeme nedeni olarak yapısındaki molekül içi kuvvetli hidrojen bağları gösterilmektedir. Bununla birlikte  $\alpha$ -1-3-D glukanın oluşturduğu heliks yapısı ılımlı alkali çözeltilerde bozunmakta ve polisakkarit tamamen çözünmektedir.



**Şekil 1.** Beta 1,3-1,6 glukan

Lentinanın moleküler formülü  $(C_6H_{10}O_5)_n$  ve moleküler kütlesi yaklaşık 500 kDa'dır. Lentinanın mafsaldaki habis tümörlerini azalttığı ve makrofaj fonksiyonlarının aktivitesine karşı bağışıklık kazanma etkisinin olduğu kanıtlanmıştır [17]. Ayrıca fare derisindeki Sarcoma 180 tümör hücrelerine karşı kuvvetli antitümör aktivitesinin olduğu bilinmektedir [18]. Beyin kanamaları, damar sertliği, virüs fonksiyonları ve birçok hastalıklar üzerinde yavaşlatıcı ve önleyici etkileride bulunmaktadır. Lentinan, T yardımcı hücrelerini ve makrofajları aktif hale getirerek ve ayrıca beyaz kan hücrelerini sararak, bakteri ve parazitlerin veya virüslerin sebep olduğu enfeksiyonlara karşı bağışıklık sistemini uyarır. Bağışıklık sistemi rahatsızlıklarında, kanser çeşitlerinde ve AIDS gibi rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır [19].



**Şekil 2.** Lentinan (1 6): (1 3)-β-D-glukan

#### 1.4.1. Glukanın İşlevleri:

**1. İmmün Sistem Regülasyonu:** Beta-glukanın en önemli biyolojik aktivitesi, immün sistemi düzenleme yetenegidir. Glukanın immüno-regulator aktivite, immün sistem kontrolünde veya makrofaj fagositozunu ayarlama da yer alan sitokinlerin makrofajlardan salınımını uyarma veya engelleme yeteneğiyle ilişkilidir. Makrofajlar, beta glukanları tanıyan ve onlara bağlanan reseptörlere sahiptirler. Makrofajlar beta-glukanların etkilerine aracılık ederler.

**2. Kansere İlişkili Aktiviteleri:** Beta-glukanın önemli biyolojik aktivitelerinden biri de onun kanser hücre büyümesi ve tümör gelişimi üzerindeki etkisidir ki bu aktivitesini immün sistemi uyarabilme yeteneği sayesinde yapar. Beta- 1,3-glukanın kanser tedavisindeki faydalı rolü 1975’de Peter W.Mansell ve arkadaşları tarafından açığa çıkartılmıştır. Dokuz hastada malignant deri kanseri nodüllerine beta-1,3-glukan enjekte edilmiştir. Kanser lezyonlarının ebatları 5 gün gibi kısa bir zaman periyodunda çarpıcı biçimde azalmıştır. Ayrıca kimyasal olarak uyarılmış farelerin karacigerlerindeki sarkoma ve melanomalarda yapılan klinik gözlemler ve deneyler suda çözünen ve çözünmeyen (1-3) D-glukanların antitümör ve antimetastatik etkilerini açığa çıkarmıştır. Beta-glukan ayrıca tümör metastazını engeller.

**3. Patojen İlişkili Aktiviteleri:** Beta-glukanın önemli biyolojik aktivitelerinden biri de, bakteriyel enfeksiyonu önlemeye yardım etme yeteneğidir.

**4. Beta glukan ayrıca vücut sağlığını destekleyen birkaç ek biyolojik aktiviteye sahiptir.** Örneğin; maya türevli glukan fiberinin besin eki olarak verilmesi insanda kan kolesterolünü düşürücü etki göstermiştir.

**5. Beta-1,3-glukanın radyasyon koruyucu etkisi** 1985’de Dr. Patchen ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir.

6. Deneysel veriler glukanların etkin bir serbest radikal süpürücü olarak görev yapabileceğini ortaya koymuştur. Serbest radikallerin yaşlanmayı hızlandırması, kansere neden olması ve diğer dejeneratif etkileri ile ilgili olarak sahip olduğu potansiyel hakkındaki bilgilerimizin ışığı altında beta-1,3-glukanın serbest oksijen süpürücü (antioksidan) etkisi özellikle çok büyük önem taşımaktadır.

### 1.5. Lektin

Lektin terimi, Goldstein'in önerisi üzerine 1981 yılında "bağışıklık sisteminden kaynaklanmayan, birden fazla şeker bağlama bölgesine sahip, hücreleri veya karbonhidrat içeren bileşikler kümeleştirerek çöktüren, protein veya glikoprotein yapısındaki moleküller" tanımlaması Uluslararası Biyokimya Birliği Adlandırma Komitesi tarafından yapılmıştır [20,21].

Günümüze kadar aglutinin, fitoaglutinin, hemaglutinin, fitohemaglutinin ve prolektin gibi değişik isimlerle anılan bilimsel lektinler, yapılan ilk çalışmalarda başlıca Leguminoseae familyası olmak üzere bitkilerden izole edildikleri için sadece bitkilere özgü bileşikler olarak düşünülmüştür [22]. Yapılan araştırmalarla lektinlerin doğada sadece bitkilerle sınırlı kalmayıp değişik biyolojik sistemlerde (bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal orjinli) yaygın olarak bulunduğu anlaşılmıştır [23,24].

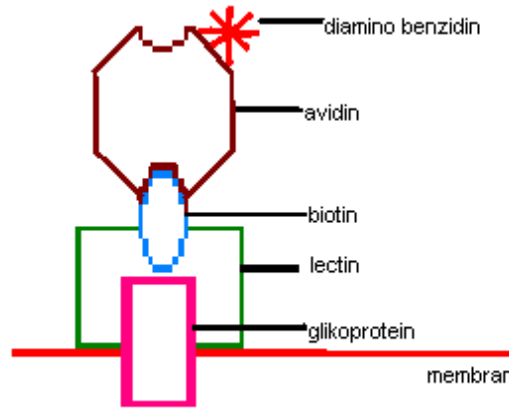
Lektinler genellikle 2 ile 4 birimden oluşurken *Triticum vulgaris*'de (WGA) olduğu gibi 18 farklı polipeptit zincirinden oluşan lektinlere de rastlanmaktadır. Her bir birim, bir karbonhidrat artığına zayıf nitelikli hidrojen köprüsü ile bağlanma özelliğindedir. Bağlandıkları karbonhidratların yapılarını değiştiren glikozidazlar ve glikoziltransferazların aksine bağlandıkları karbonhidratlarda yapısal değişikliğe neden olmamaları ile enzimlerden farklılık gösterirler. Lektinler üretimlerinin antijen uyarılmasıyla değil genler tarafından kontrol edilmesiyle de antikorlardan farklıdır [25].

Glikoprotein yapısındaki lektinlerin karbohidrat birimlerinde en çok mannoz, glukozamin, galaktozamin, N-asetilglukozamin ve N-asetilgalaktozamin bulunur. Az miktarda ise ksiloz, arabinoz ve fukoza rastlanılır. Protein kısmındaki total aminoasit içeriklerinin % 30 kadarını aspartik asit, serin ve treonin oluşturur. Biyolojik aktiviteleri için yapılarındaki  $Ca^{2+}$  ve  $Mn^{2+}$  iyonlarına ihtiyaç duyarlar [26]. Molekül ağırlıkları ise 26 000 ile 400 000 dalton arasında değişmektedir [24].

Lektinlerin biyolojik özelliklerinden biri de insan ve hayvanlarda eritrositlerin ve çeşitli hücre tiplerinin kümeler halinde çökmelerine neden olmalarıdır. Bu olay aglutinasyon olarak

tanımlanmakta olup lektinler glikokonjugatların karbohidrat birimleri arasında anahtar kilit prensibi esasına göre şekillenir. Aglutinasyon lektinlerin protein kısımlarının kendi reseptörlerinin yapısındaki karbohidrat zincirlerinden en az iki karbohidrat yapısına bağlanması olayına dayanır [27].

Lektinlerin tedavi amaçlı kullanılabileceklerine ilişkin birçok araştırma yapılmıştır. İşaretli lektin kullanılarak çeşitli metabolik faaliyetlerin ve hastalıkların teşhisi sağlanmıştır. Örneğin kanser teşhisinde lektin reseptörlerinin normal hücrelerde dağınık halde bulunduğu, kanserli hücrelerde ise birarada bulunduğu bilinmektedir [28,29]. Gül, Anadolu ve arkadaşları deri kanserinin teşhisinde işaretli lektin kullanmışlardır.



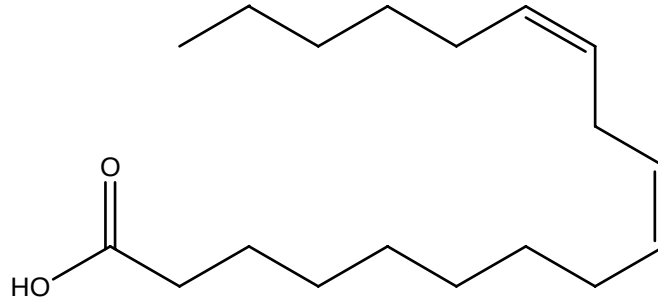
**Şekil 3.** Lektinin yapısı.

Metastazın şekillenmesinde, metastaz yapan hücrenin karbohidrat artıkları hedef dokunun lektinlerine tutunmaktadır. Beuth ve arkadaşları 1988’de yaptıkları *in vitro* çalışmalarda birçok insan tümör hücresinin hepatositlere adezyonlarının galaktoz veya arabinogalaktan kullanımı ile engellendiğini rapor etmişlerdir [30]. Birçok lektinin *in vitro* ve *in vivo* antitümör özelliği gösterdiği bilinmektedir. Lektinler, özellikle kanserli hücrelerin zarlarına veya reseptörlerine bağlanarak sitotoksiste, apoptoz ve tümör gelişmesini engelleyen tedavi edici ajanlar olarak kullanılmaktadırlar [31]. Bugün kullanılmakta olan kemoterapötik ilaçların normal vücut hücreleri üzerine oldukça fazla yan etkileri bulunmaktadır. Hücreler için toksik olan ilaçlar (metotreksat, 5'-dezoksifloruridin, filotoksin etoposid vs.) eğer tümörlü dokular için spesifik olan bir karbohidrat ünitesi ile bağlandıktan sonra vücuda verilirse toksik madde tümör hücrelerinde lokalize olacak ve bunun normal somatik hücrelerdeki etkisini minimuma indirilecektir.

Spesifik karbohidrat bağlama özelliklerinden dolayı lektinler, kompleks hücre ekstraktlarından glikoproteinlerin ve enzimlerin saflaştırılması, glikoprotein ve polisakkaritlerin izolasyonu, sodyum dodesil sülfatlı poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile glikoproteinlerin saptanması, kanser araştırmaları ve hücre tiplmesi gibi yaygın araştırma alanlarında güçlü vasıtalar olarak kullanılmaktadır.

### 1.6. Linoleik Asit

Birden fazla çift bağ içeren yağ asitleri ise çoklu doymamış yağ asitleri veya polienoik yağ asitleri olarak isimlendirilir. Linoleik (C18:2), linolenik (C18:3), araşidonik (C20:4), eikosapentaenoik (C22:5) ve dokosaheksaenoik (C22:6) asitler çoklu doymamış yağ asitlerinin en önemlileridir [32].



**Şekil 4.** Linoleik asitin yapısı

Linoleik asit, mantarın tadına katkıda bulunan ve mantarlarda en yaygın olarak bulunan aromatik bileşiklerden mantar alkolü olan 1-oktan ve 3-ol varlığının kanıtı olabileceği düşünülmektedir.

Bilindiği gibi, linoleik asit, linolenik asit ve oleik asit doymamış asitlerden bazılarıdır. Bu tür doymamış yağ asitleri memeli hücrelerinde sentezlenemez ve bu yüzden beslenmeyle alınmalıdır. Doymamış yağ asitlerinin eksikliği insan vücudunda zararlı ve anormal değişimlere neden olur.

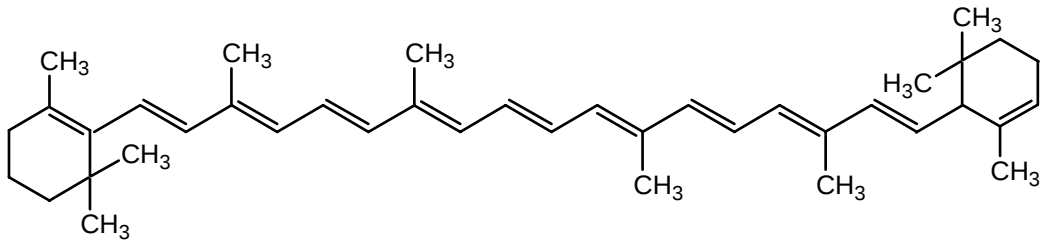
Linoleik asidin az alınması ile göğüs kanseri vakalarının sık görülmesi arasında çok net bir ilişki vardır. Linoleik asit tıbbi uzmanlar tarafından kandaki kolesterol seviyesini düşürdüğü için tavsiye edilmektedir. Linoleik asit kalp hastalıklarının tedavisinde kullanıldığı kadar, kan pıhtılaşması, inflamatuvar ve immunolojik reaksiyonlar gibi normal psikolojik proseslerin yer aldığı hücre membranlarında da yer alırlar.

Pariza ve arkadaşları tarafından 1987’de tesadüfen antikanserojen etkisinin keşfedilmesinden sonra linoleik asitin önem kazanması ve o tarihten günümüze kadar sağlığa faydaları ve pek çok etkisi bulunmuştur [33].

Bu faydalı etkilerinin başlıcaları: Vücut yağ miktarını azaltır. Diabetes mellitus (DM)’ta artmış insülin miktarını azaltır. Antikanserojenik etki gösterir. İmmüniteyi güçlendirir. İnflamasyonu azaltıcı etkisi vardır. Kan lipidlerini düşürücü etkisi vardır. Antiaterosklerotik etki gösterir. Metabolik hızı artırıcı etkisi vardır. Kemik oluşumu ve kas kitlesini arttırıcı etkisi vardır.

### 1.7. Beta Karoten

Gıdalarda bulunan karotenoidler, sekiz tane beş karbonlu izoprenoid biriminin biraraya gelmesiyle oluşan 40 karbonlu polienlerdir. Doğada 670’den fazla karotenoid bulunmakta ve bunların çoğu antioksidatif aktivite göstermektedir. Gıdalarda bulunan en önemli karotenoidler  $\beta$ -karoten,  $\alpha$ -karoten, likopen, lutein ve  $\beta$ -kriptoksantindir.  $\beta$ -Karoten vücutta A vitaminine dönüştürülmektedir. Sarı turuncu renkli meyve ve sebzeler, koyu yeşil renkli sebzeler karotenoid kaynağı gıdalar olarak gösterilmektedir. C40 yapısındaki terpenlerdir. Karotenoidler en önemli tetraterpenlerdir. Asiklik, mono ve bisiklik tetraterpenler de bulunmaktadır [34].



**Şekil 5.** Beta karotenin yapısı

A vitamininin yapı taşıdır. Vücutta A vitamini haline dönüştürülür. Ispanak, lahana gibi yeşil yapraklı sebzeler, kavun, şeftali, kayısı gibi meyveler ve havuç en önemli kaynaklarıdır. Yüksek dozda alınmasının yararları konusunda çalışmalar halen sürmekle birlikte, kanser, damar sertliği ve katarakt gibi hastalıkları önlediği yolunda önemli bulgular elde edilmiştir.

Beta karoten vücutta kullanıma hazır bir yapıda değildir. Bu nedenle ön vitamin A denmektedir. Yağda erir. Özellikle çok zararlı etkilere sahip serbest kimyasal kökleri nötralize

eder ve güçlü bir antioksidandır. Bu özellikleri ile kanserden ve infeksiyon hastalıklardan korunmada önemli bir yer tutar.

Yapılmakta olan bilimsel çalışmalar beta karotenin tek oksijenli serbest radikallerin ortadan kaldırılması ve yaşlanma olayının yavaşlatılması üzerinde yoğunlaştı. Bu serbest radikallerin ortadan kaldırılması ile kanserleşmelerin engellendiği düşünülmektedir. Amerikan Kanser Derneğinin açıklamalarına göre ağız bölgesinde bulunabilen kanserleşme odakları, beta karoten alanlarda %53 oranında azalıyor. Beta karotenin etkisinin kolesterolün oksitlenmesini durdurması ile ortaya çıkan antioksidan aktiviteden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Niki ve arkadaşları, organizmaların hemen hemen tamamı serbest radikallerin zararlarına karşı süperoksid dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi oksidatif enzimlerle yada  $\alpha$ - tokoferol, askorbik asid, karotenoidler, polifenoller ve glutatyon ile iyi korunmaktadırlar.

Mau ve ark., Simic hemen hemen tüm organizmalar antioksidan kökenli savunma ve tamir sistemine sahip olmasına rağmen bunların oksidatif zarara karşı koruyuculukları yaşlanmayla etkisini yitirerek zarara karşı koruyuculuğu etkisiz hale gelir [35,36,37]. Sonuçta kanser, kalp-damar hastalıkları, bağışıklık sistemi zayıflıkları, beyin fonksiyonları bozuklukları ve katarakt gibi vücudu dejenere eden hastalıklar baş gösterir [38].

#### **1.7.1. Beta Karoten ve Kanser**

Tibbî denemelerde sentetik  $\beta$ -Karoten kullanımında akciğer ve prostat kanseri oranının arttığı ve bu artışın sigara içenlerde ölüm oranını artırdığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar beta karoten takviyeleri için görülmüş, içinde doğal olarak beta karoten bulunduran yiyeceklerde görülmemiştir.

Britanya kanser örgütü Cancer Research Campaign, beta-karoten takviye ambalajlarında sigara içenlere bu takviyelerin akciğer kanser riskini artıracığına dair ikaz etiketleri konması gerektiğini öne sürmüştür [39].

The New England Journal of Medicine dergisi günlük E vitamini (alfa tokoferol) ve beta karoten gıda takviyesinin akciğer kanserine etki üzerine bir makale yayınlamıştır [40]. Bu çalışma vitamin takviyeleri üzerine yapılmış ve araştırmacılar karotenoidli meyve ve sebzelerin tüketimi ile akciğer kanser oranlarının azalması arasında bir bağlantı olduğu bilinmektedir. Ancak bu araştırmada  $\beta$ -Karoten takviyesi alanlarda akciğer kanseri oranında bir azalma bulamadıkları gibi, bu gıda takviyelerinin zararlı etkileri olduğunu buldular.

ABD Milli Kanser Derneği'nin (NCI) dergisinde 1996'da yayınlanan bir yayında, A vitamini (retinil palmitat olarak) ve  $\beta$ -Karotenin kanser koruyucu bir etkisi olup olmadığı hakkında bir denemenin sonuçları verilmiş olup sentetik beta-karoten gıda takviyesi kullanan katılımcılarda akciğer kanser riskinde bir artış bulunmuştur [41]. Bilimsel literatürdeki tüm randomize kontrollü çalışmaların bir değerlendirmesinde  $\beta$ -Karotenin ölüm oranını %5 artırdığı bulunmuştur [42].

### 1.7.2. Beta Karotenin Faydaları

$\beta$ -Karoten serbest radikallerin nötralize edilmesine yardımcı olan güçlü bir antioksidandır. Bağışıklık sistemini destekleyerek vücudun enfeksiyonlara karşı mücadele etmesini sağlar. Kansere karşı koruyucu etkisi vardır. Ağız, göğüs, mide, kalın bağırsak, serviks, yemek borusu gibi kanser türlerinin görülme sıklığının yetersiz beta karoten alımıyla ilişkisinin olduğunu tespit eden araştırmalar vardır. Kalp damar hastalıklarını önleyici etkisi vardır. Damar sertliğini ve kalp krizi riskini azaltır. Katarakt oluşumunu engelleyebileceği yine yapılan bazı araştırmalarda görülmüştür.

### 1.8. Enzimler

Enzimler canlı hücreler tarafından sentezlenen ve canlı metabolizmasındaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün oluşturmada %100 ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Enzimlerin, üzerinde etkili oldukları ve ürüne dönüştürdükleri bileşiklere “*Substrat*”denir.

Enzimle katalizlenen reaksiyonların çoğu 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. Birim zamanda bir mol enzim tarafından ürüne dönüştürülen substratın mol sayısına turnover sayısı denir. Karbonik anhidraz, enzimler arasında en yüksek turnover sayısına sahip olanları arasındadır ( $600.000\text{ s}^{-1}$ ). Yani bir karbonik anhidraz molekülü  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3$  tarafından reaksiyonu 1/600.000 saniyede, yani 1,7 mikro saniye de gerçekleştirilmektedir [44].

Enzimlerin büyük bir kısmının etki gösterebilmesi için protein yapılı olmayan bir kofaktöre gereksinimi vardır. Kofaktör, koenzim adı verilen organik bir bileşik veya metal iyonu olabilir. Enzim, kofaktörü ile beraber bulunuyor ise *holoenzim*, holoenzimin kofaktörsüz protein kısmına *apoenzim* denir. Kofaktör gerektiren enzimlerde; uygun kofaktör yoksa apoenzimin biyolojik aktivitesi yoktur [45]. Bazı enzim-kofaktör bağlanmaları kovalent yapıda veya diyalizle uzaklaştırılamayacak kadar sıkıdır. Böyle kofaktörlere “*prostetik grup*” adı

verilir [46]. Kofaktör olarak metal iyonu kullanan enzimlere metaloenzim denir. Metal iyonları ya asit-baz katalizi, ya kovalent kataliz yapar, yada enzimin konformasyonunda değişiklik yaparak sustratın bağlanmasını kolaylaştırır [45].

Enzimlerin hem “*in vivo*” hem de “*in vitro*” aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından azaltılması hatta yok edilmesi olayına “*inhibisyon*” adı verilir. Buna sebep olan bileşiklere “*inhibitor*” denilir. İnhibitörler genellikle küçük molekül kütlesine sahip bileşikler veya iyonlardır.

Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturduğundan, önemli bir olaydır. Birçok ilaçlar ve zehirli bileşikler de etkilerini bu yolla gösterir. İnhibitörler hem enzim etki mekanizmalarının, hem de metabolik yolların aydınlatılmasında önemlidir [43].

Bir enzimin katalitik etkisi birçok yollarla değiştirilebilir. Bir protein olan enzim molekülü denatüre edilirse üç boyutlu yapısı bozulur ve bunun sonucu enzimin katalitik etkisi kaybolur. Enzimin aktif bölgesini oluşturan fonksiyonel grupları bloke eden herhangi bir reaksiyon, enzim aktivitesini değiştirir veya yok eder. Bu tip bir inhibitör enzime katılınca enzimin orijinal aktivitesi tekrar kazanılmayacak bir şekilde değişikliğe uğrar.

İnhibisyonlar; dönüşümlü (reversible) veya dönüşümsüz (irreversible) olabilir [45].

## 1.9. Karbonik Anhidraz

### 1.9.1. Dağılımı ve Fizyolojik Önemi

Karbonik anhidraz (CA) genel olarak metabolik CO<sub>2</sub> transportunun sağlamanın yanı sıra, bir çok dokularda, H<sup>+</sup> ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>’in birikiminde de rol almaktadır. Bu dokular arasında böbrek, gastrit mukoza ve göz lensini sayabiliriz. Bunlardan başka histokimyasal metodlarla, tükürük bezleri, kaslar, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokularda da CA’ya rastlanmış ve bunların bazıları saflaştırılarak, biyokimyasal özellikleri incelenmiştir.

Eritrosit CA’sının en önemli fonksiyonu ise, doku kılcal damarlarında, metabolizma ürünü olan CO<sub>2</sub>’i H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>’e, akciğer pulmoner kapilerde ise H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>’i CO<sub>2</sub>’e dönüşmesi reaksiyonunu katalizleyerek, solunum olayında yer almaktadır.



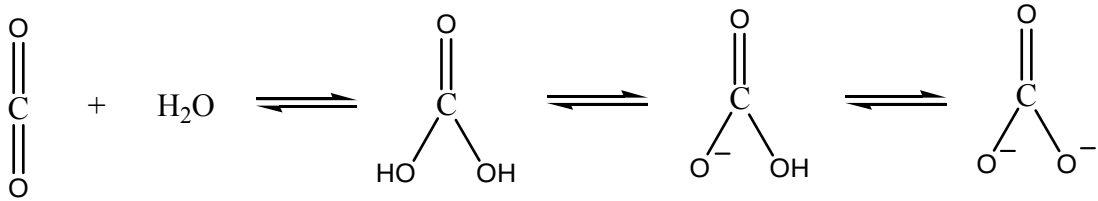
Karbonik anhidrazın bulunduğu canlı dokuların da bilinen veya muhtemel olan fizyolojik rolleri Maren ve Carter tarafından geniş bir şekilde anlatılmıştır [47,48].

Son olarak, karbonik anhidrazın  $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$  ve  $\text{H}_2\text{O}$  arasındaki dönüşümleri gerçekleştirmesi ile birçok dokularda hayati öneme sahip olduğunu söylemek mümkün.

### 1.9.2. Fiziksel, Kimyasal ve Kinetik Özellikleri

Son on yıldan beri karbonik anhidraz, enzimatik katalizin prensiplerinin aydınlatılmasında, önemli bir rol oynamaktadır. CA, metabolizmada son derece önemli rol oynamasının yanı sıra, çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesi kayıp olmadan uzun süre bekletilmesi gibi avantajlı özelliklere sahiptir [49].

Karbonik anhidraz,  $\text{CO}_2$  ve  $\text{H}_2\text{CO}_3$  veya ortamın pH'sına göre  $\text{HCO}_3^-$  ve  $\text{CO}_3$  iyonları arasında dönüşümleri katalizleyen bir enzimdir. Düzlem bir molekül olan  $\text{CO}_2$ 'in farklı açılara sahip piramidal yapıda  $\text{H}_2\text{CO}_3$ 'e kendiliğinden dönüşümü oldukça yavaştır.



Karbonik anhidrazın bilinen on altı izoenziminden üçü olan CA I, CA II ve CA III kristallendirilmiş ve yapıları hakkında detaylı bilgiler elde edilmiştir. Üç izoenzim de sitoplazmada çözünmüş halde bulunur. Molekül ağırlıkları 28000 dalton olup, 259 veya 260 amino asitten ibaret tek bir polipeptid zincir halindedir. Her bir enzim molekülünün aktif bölgesi, yaklaşık tetrahedral geometriye sahip, üç histidin imidazol halkası ve bir su molekülü ile koordine olmuş  $\text{Zn}^{+2}$  iyonu ihtiva etmektedir.  $\text{Zn}^{+2}$  iyonun kataliz olayındaki fonksiyonu vazgeçilmez olup, uzaklaştırılmasıyla elde edilen apo-CA'lar tam manasıyla aktiveden yoksundurlar [50, 51].

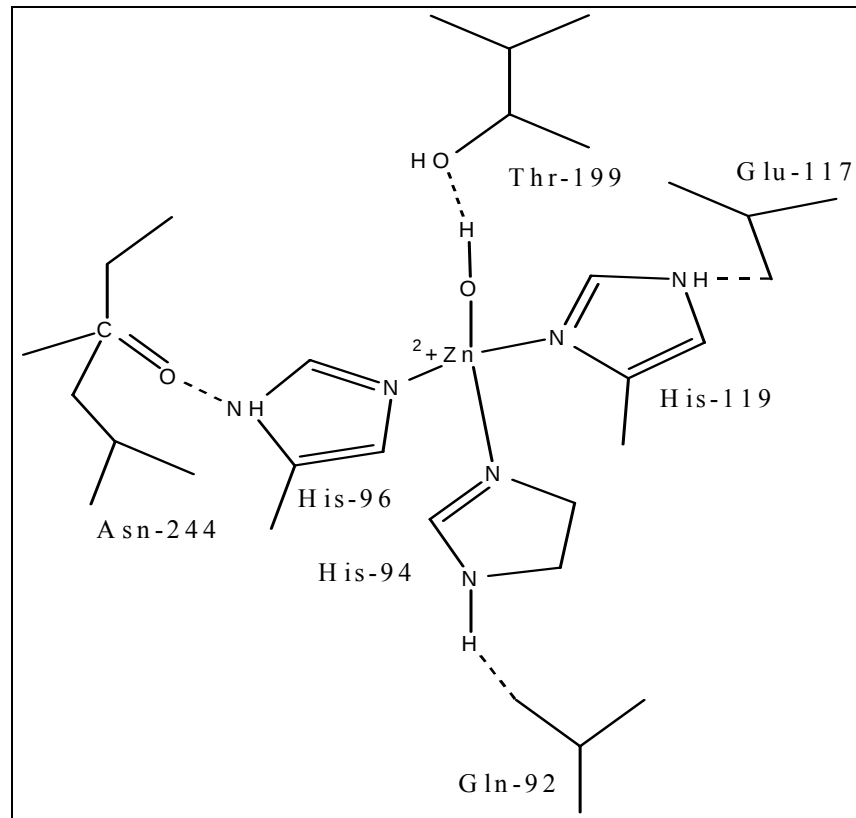
Karbonik anhidraz izoenzimlerinin izoelektrik pH'ları türden türe farklılık göstermekte ve aktivitesi ile bir korelasyona rastlanmamaktadır. Amino asit bileşimleri yönünden benzerlik gösteren memeli, bakteri ve balık CA'ları ise bunlara nispeten daha yüksek seviyede siseitin taşırlar [52, 53].

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$  ve  $\text{H}_2\text{O}$  arasındaki dönüşüm reaksiyonlarının katalizlemesinin yanı sıra, elektrofilik bir merkeze, nükleofilik atakları içeren,

bazı reaksiyonlarıda katalizlediği bilinmektedir. Bu reaksiyonlar, aldehit, piruvat ve alkil piruvatların hidratasyonu, ayrıca piruvik sülfonik ve fosforik esterlerinin hidrolizini içeren dönüşümlerdir [54]. Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesini ortaya koyan bu özelliği ile organizmada fizyolojik bir rolü olup olmadığı henüz bilinmemektedir [55]. Ayrıca tavşan CA III izoenzimin ise hem asit hem de alkalin fosfataz etkisi olduğu bildirilmiştir [56].

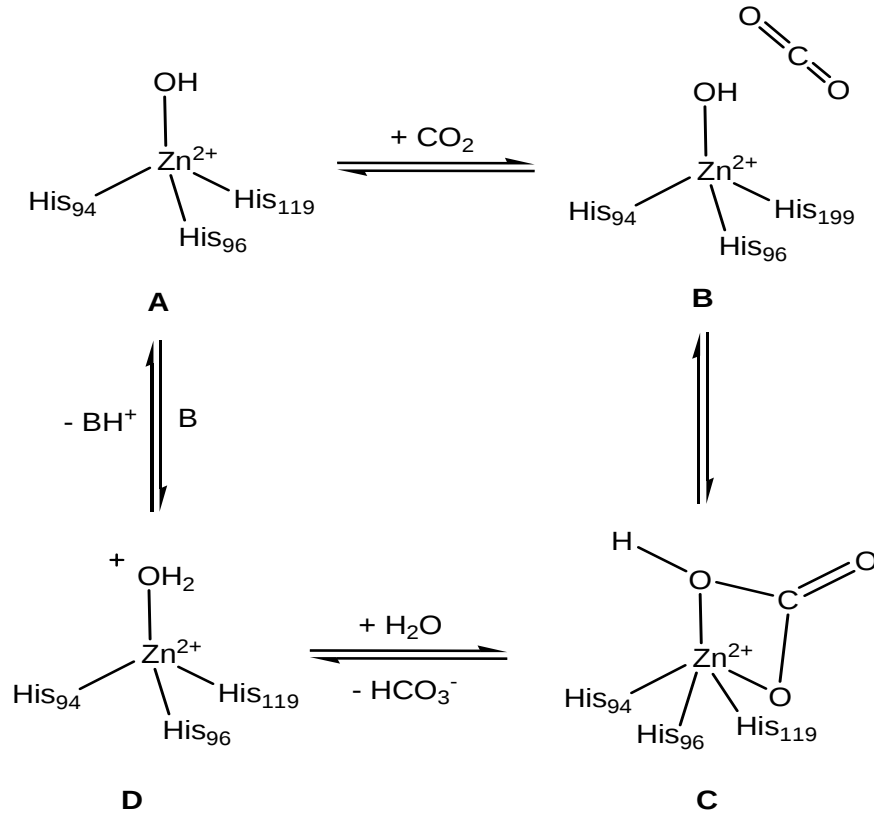
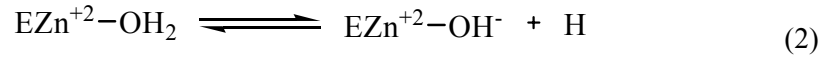
### 1.9.3. Karbonik Anhidraz Enziminin Katalitik Mekanizması

Son 60 yıldır yapılan çalışmaların neticesinde aydınlatılmaya çalışılmıştır. Buna göre CA enzimi, metabolizma için son derece önemli olmasının yanı sıra, çözelti ortamında kararlı olması ve uygun şartlar altında aktivitesi kaybolmadan uzun süre bekletilmesi gibi avantajlı özelliklere sahiptir [49].



**Şekil 6.** İnsan CA II'deki metal merkezin “doğrudan” ve “dolaylı” ligandları gösteren şematik görünümü.

Katalitik olarak bu form inaktiftir. Tekrar temel A formunu oluşturmak için aktif bölgeden çevresine proton transferi olur [57]. İşlem şematik olarak şöyle gösterilebilir

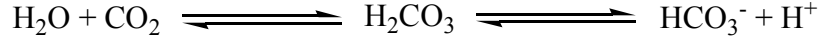


**Şekil 7.** Karbonik anhidrazın katalizlediği CO<sub>2</sub>-hidrataz reaksiyonu mekanizmasının gösterilişi.

Katalizdeki hızı sınırlayan basamak ikinci reaksiyondur. CA II, CA IV, CA V, CA VII ve CA IX gibi katalitik olarak çok aktif olan izoenzimlerde, bu işlem aktif bölgede yerleşmiş histidin (His-64) rezidüsü yardımıyla çok etkili bir proton transfer işlemi gerçekleştirilir [58].

#### 1.9.4. Karbonik Anhidraz Aktivitesi

Enzimin CO<sub>2</sub>'i hidratasyonu bikarbonatın dehidratasyonu ve bazı esterleri hidrolizi gibi özelliklerinden yararlanılarak belirlenir.



Yukarıdaki reaksiyonda görüldüğü gibi, ortama göre CO<sub>2</sub> gazı çıkmakta veya harcanmaktadır. Aynı zamanda H<sup>+</sup> konsantrasyonu artmakta veya azalmaktadır. Açığa çıkan veya azalan CO<sub>2</sub> gazı, kantitatif olarak manometrik metodun reaksiyon pH'sının değişken olması, CO<sub>2</sub>'in suda sınırlı çözünmesi ve uzun zaman alması gibi dezavantajları vardır [59].

İkinci olarak, ortamdaki H<sup>+</sup> konsantrasyonu; pH'nın yükselmesi veya düşmesi için geçen süre potansiyometrik yolla inhibitörle belirlenebilir. Fakat bu metodun kısa zaman alması gibi bir avantajının yanı sıra, reaksiyon sırasında pH'nın değişken olması CO<sub>2</sub>'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 [58,60].

Enzimin saflaştırma basamağında aktivite ölçümleri, genellikle bütün araştırmacılar tarafından Wilbur-Anderson metodu ile yapılmaktadır. Bu yöntemde; CO<sub>2</sub> hidratasyonunda pH'nın 8,2'den 6,3'e düşmesi için geçen süre, pH-stat metodu kullanılarak bulunmaktadır. Enzim birimi ise, enzimsiz CO<sub>2</sub>-hidratasyon süre (t<sub>0</sub>) ile enzimli reaksiyon süresi (t<sub>c</sub>) arasındaki farkın, t<sub>c</sub>'ye bölünmesi ile belirlenmektedir. Buna göre enzim ünitesi, enzimsiz reaksiyon süresini yarıya düşüren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır [59].

Enzimin esterase aktivitesi ise, p-nitro fenil asetatın hidrolizi ile açığa çıkan p-nitro fenol miktarının 348 nm'de spektrofotometrik ölçümü ile tayin edilmektedir [59,61].

#### 1.9.5. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

Yapılan çalışmalarda karbonik anhidraz enziminin en güçlü organik inhibitörünün aromatik ve heteroaromatik sülfonamidler olduğunu göstermektedir. Sülfonamidlerin kolaylıkla iyonik yapı kazanmaları en çarpıcı özelliklerinden biridir. Bu iyonik yapı aşağıdaki reaksiyonda görülmektedir.



Sülfonamidin bu özelliği karbonik anhidraz enzimi üzerindeki inhibisyon için son derece önemlidir. Ayrıca sülfonamid ligand olarak kullanılmaktadır [62,63].

Sülfonamidler, süstitüe olmamış bir -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> grubu veya bir -SO<sub>2</sub>NH(OH) grubu içeren etkin inhibitörlerdir. Sülfonamid grubunun azot atomu aracılığıyla ilk olarak;

enzimin aktif bölgesindeki metal iyonuna anyonlar şeklinde ( $R-SO_2NH^-$  veya  $R-SO_2N-OH^-$ ) iyonik olarak bağlanırlar. İkinci olarak da hidrofobik etkileşmelerle inhibitörün enzime bağlanması tamamlanmış olur. Sülfonamidlerin, karbonik anhidraz enzimine güçlü bir şekilde bağlanması; bu iki etkinin toplamının bir sonucudur [64,65].

Karbonik anhidraz inhibitörlerini yapılarına ve etki mekanizmalarına göre ayırmak mümkündür. Sülfonamidlerden elde edilen bu ilaçlar sistemik karbonik anhidraz inhibitörleri ve topikal karbonik anhidraz inhibitörleri olarak iki sınıfta incelenir.

#### **1.9.6. Göz bozuklukları için ilaçlar olarak karbonik anhidraz inhibitörleri**

2002 yılına kadar dünyada glokom hastası sayısı yetmiş milyona ulaşmıştır. Glokom, çok sayıda hastalığı içine alan bir terimdir. Bununla birlikte açık halka glokom hastalığı, şimdiye kadar en yaygın hastalık türü olarak bilinmektedir. Göz hastalıkları içinde körlüğe en fazla glokom neden olur (% 15–20). ABD’de körlerin % 10–11 bu hastalıktan dolayı gözlerini kaybetmişlerdir. Yine aynı ülkede beyazlarda en fazla körlük nedeni olan üçüncü hastalık olarak belirtilmiştir [66,67].

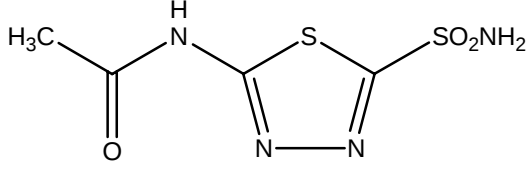
Glokom hastalığı, yüksek göz içi basıncıyla (intro ocular pressura, IOP) ortaya çıkarak, dönüşümsüz körlüğe sebep olmaktadır. Hastalığın en belirgin risk faktörü göz içi basıncının yükselmesidir. Diğer risk faktörleri miyopi, diyabet, yetersiz kan dolaşımı, yaş, yüksek göz tansiyonu, sistemik hipertansiyon ve kalıtım yolu ile aktarılması sıralanabilir. Fakat göz içi basıncı 22 mm Hg’den daha düşük (yani normal) hastaların % 20’sinde de glokom hastalığı rastlanmaktadır. Glokom’u en iyi tanımlayanlar, görme belgesi ile ilgili baştaki sinirleri karakterize eden optik nöropati uzmanlarıdır.

Göz içi basıncının kontrolünde çok önemli rolü olan karbonik anhidrazın inhibisyon yolu ile glokomlu hastaların göz içi basıncı düşürülmektedir. Karbonik anhidrazın güçlü inhibitörleri olan sülfonamidleri 1940 yılında Mann ve Keilin sentezlemiştir.

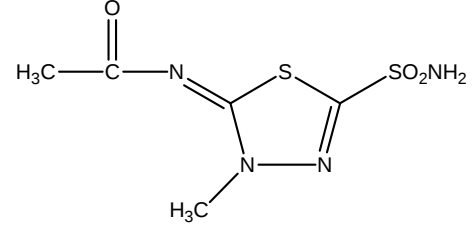
Glokom tedavisinde uzun zamandan beri 4 çeşit sistemik bileşikler kullanılmaktadır. Bu bileşikler asetozolamid, metazolamid, etokzolamid ve diklorfenamid bileşiklerdir [68,69].

Göz damlası olarak kullanılan suda çözülen sulfonami CA’ların geliştirilmesi 1990’lü yıllarda başladı ve 1995 yılında bu tür ilk farmakolojik etmen olan dorzolamid Trusopt markasıyla piyasaya çıktı. Yapısal olarak benzer başka bir bileşen olan brinzolamid glokomanın topikal tedavisi için (Alcon tarafından Azopt markasıyla) onaylanmıştır.

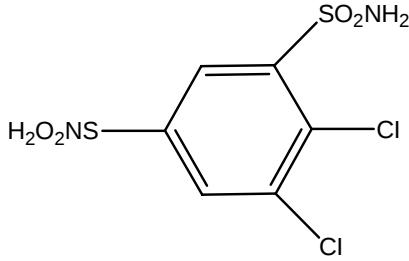
## Sistemik karbonik anhidraz inhibitörleri



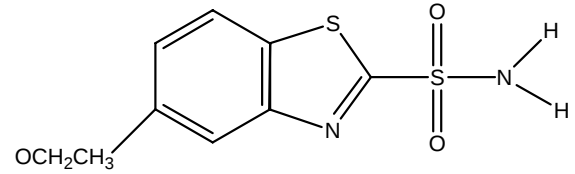
Asetazolamid



Metazolamid

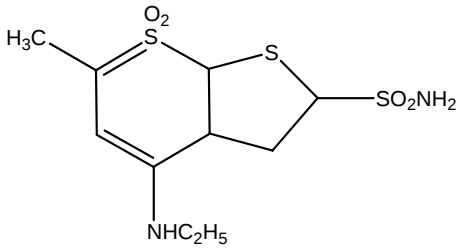


Diklorfenamid

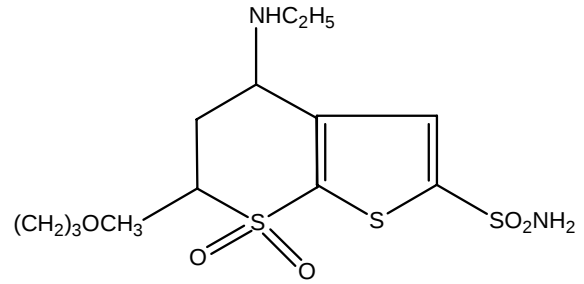


Etokzolamid

## Topikal karbonik anhidraz inhibitörleri



Dorzolamid



Brinzolamid

Dorzolamid ve brinzolamide suda çözülen güçlü CA inhibitörleridir ve korneaya nüfuz etmek için yağda yeterince çözülebilirler ve sırasıyla hidroklorik asit tuzu (5.5 pH değerinde) yada serbest baz (free base) topikal olarak uygulanabilirler. Bu iki ilaç IOP'nin azaltılmasında etkilidir ve sistematik olarak kullanılan ilaçlarla karşılaştırıldığında daha az yan etki gösterirler. Dorzolamid göz damlası solusyonlarının asidik pH düzeyinden kaynaklanan gözün batması, yanması ve kızarması, bulanık görmek ve prurit (kaşıntı) gibi gözlemlenmiş yan etkilere sahiptirler. Dolayısıyla doğal antiglokoma ilaçların bulunması büyük önem kazanmıştır. Bu yüzden bu çalışmada mantar etken maddelerinin antiglokoma etkisi incelenmiştir.

## 2. MATERİYAL ve YÖNTEM

### 2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan Sepharose-4B, *p*-nitrofenil asetat, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), L-tirozin, trihidroksi metil aminometan (Tris), siyanojen bromür, 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.

### 2.2. 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. Shimatzu Mar. + AKS

pH metre: Schott Instruments / Lab850

Peristaltik pompa: Ismater 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

Mağnetik karıştırıcı: Heidolp MR 3001

Çalkalayıcı: GFL

### 2.3. Biyokimyasal Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

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

- 1) 0,05 M Tris-SO<sub>4</sub>, pH=7,4 (Esteraz aktivitesi ölçümü ve diyalizde kullanılan tampon): 6,055 g (0,05 mol) Tris, 950 mL destile suda çözüldü. 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile pH=7,4'e kadar titre edildi. Daha sonra toplam hacim 1 litreye destile su ile tamamlandı.
- 2) 0,2 M NaHCO<sub>3</sub>, pH=8,8 (Sepharese - 4B matriksi üzerinde afinite jeli hazırlanırken kullanılan tampon): 16,8 g (0,02 mol) NaHCO<sub>3</sub>, 950 mL destile suda çözüldü. 1 N 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 çözümlü, pH=8,2'ye kadar 0,1 M HCl ile titrasyonundan sonra destile su ile 1 litreye tamamlandı.
- 4) 25 mM Tris-HCl / 0,1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH=8,7 (afinite jelinin dengelenmesi için kullanılan tampon): 3,0275 g (25 mmol) Tris ve 14,2 g (0,1 mol) Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 950 mL destile suda çözüldü. 1 N HCl ile pH=8,7'ye getirildikten sonra destile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.
- 5) 25 mM Tris – HCl / 22 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH=8,7 (hemolizatın tatbikinden sonra afinite jelinin yıkanmasında kullanılan tampon): 3,0275 g (25 mmol) Tris ve 3,124 g (22 mmol) Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 950 mL destile suda çözümlü, 1 N HCl ile pH= 8,7'ye getirildikten sonra hacim 1 litreye destile su ile tamamlandı.
- 6) 0,1 M NaCH<sub>3</sub>COO / 0,5 M NaClO<sub>4</sub>, pH=5,6 (kolona tutunmuş HCA-II izoenzimi ve CA enziminin elüsyonu için kullanılan tampon çözelti): 9,187 g (0,075 mol) NaClO<sub>4</sub> ve 2,09 g (0,15 mol) NaCH<sub>3</sub>COO.H<sub>2</sub>O, 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) CO<sub>2</sub> çözeltisi (CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesinde kullanılan çözelti): 0 °C'de yarım saat süreyle saf suyun içerisinde CO<sub>2</sub> gazı geçirilerek hazırlandı.
- 8) Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti): 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye %95'lik 100 mL fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi, saf su ile 1 litreye tamamlandı.
- 9) Boyama çözeltisi (jelin boyanması için kullanılan çözelti): 0,1 g Coomassie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit ve %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.
- 10) Yıkama çözeltisi (jelin yıkanması için kullanılan çözelti): %10 asetik asit olacak şekilde metanol ve su karıştırılarak yeterli miktarda hazırlandı.
- 11) Sabitleştirme çözeltisi (jeldeki proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti): %50 izopropanol, %10 TCA, %40 saf su olacak şekilde yeteri kadar hazırlandı.

- 12) İnhibitör stok çözeltileri: CA inhibitörü olarak temin edilen bileşiklerin % 1'lik çözeltilerini hazırlamak için; her bir bileşikten 5'er mg alınıp 1 mL etil alkolde çözüldükten sonra, hacimleri 5'er mL'ye tamamlandı.

## 2. 5 Yöntemler

### 2.5.1 Protein tayini

#### 2.5.2. Kalitatif protein tayini

Kromatografi işlemleri sonunda eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Bu metodun esası; 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbans göstermesine dayanmaktadır. Fraksiyonlar kuvartz küvetlere alınarak, absorbansları spektrofotometrede köre (ilgili tampon çözeltiye) karşı okundu.

#### 2.5.3. Bradford (coomassie blue) yöntemi ile protein tayini

Bu yöntemle, afinite kromatografisi ile saflaştırılan enzim çözeltisinde ve hemolizatta protein tayini yapıldı. Bu yöntem, coomassie brilliant blue G-250'nin fosforik asitli ortamda proteinlere bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks, 595 nm'de maksimum absorbans gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir (2 dakika). Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır. [70]

Tayin işlemlerinde; 1 mL'sinde 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 coomassie reaktifi tüplere ilave edildi ve vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0,1 mL aynı tampon ve 5 mL Coomassie reaktifinden oluşan karışım kullanıldı. Absorbans değerlerine karşılık gelen mikrogram protein değerleri standart grafik halinde verildi.

#### 2.5.4. Karbonik anhidraz aktivitesi tayini

##### 2.5.4.1. CO<sub>2</sub>-Hidrataz aktivitesi tayini

Aktivite tayini Wilbur Anderson metodu ile yapıldı. Bu yöntemde; CO<sub>2</sub>'in hidratasyonu sonucu açığa çıkan H<sup>+</sup> sebebiyle pH'nın 8,2'den 6,3'e düşmesi için geçen süre, pH-stat metodu kullanılarak bulundu. Tampon olarak da, pH'sı 10 olan karbonat tamponundan (0,15 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>) yararlanıldı. Enzim birimi ise; enzimsiz CO<sub>2</sub> hidratasyon süresi ( $t_0$ ) ile enzimli reaksiyon süresi ( $t_c$ ) arasındaki farkın,  $t_c$  'ye bölünmesi ile belirlendi.

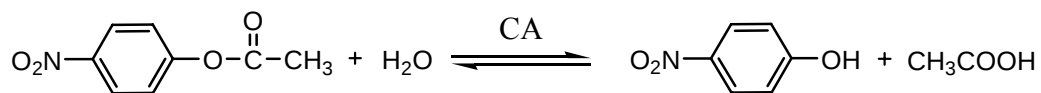
Deneyde reaksiyon tüpüne önce 1 mL veronal tamponu, 0,6 mL su, 0,1 mL enzim ve 2,5 mL doygun CO<sub>2</sub> çözeltileri konuldu. pH'metreden pH'ın 6,3 civarına düşmesi için geçen süre kronometre ile belirlendi ( $t_c$ ). Aynı işlemler her numunenin çalışılmasından önce, enzim çözeltisi yerine saf su konularak yapıldı ( $t_o$ ). 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 yöntemle göre CA aktivitesi için bir enzim ünitesi (EU), enzimsiz olarak meydana gelen CO<sub>2</sub> hidrasyonu süresini, yarıya indiren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

Yani;  $EU = (t_o - t_c) / t_c$

formülüne göre kullanılan enzim çözeltisi hacmi için, enzim ünitesi hesaplanmıştır.

#### 2.5.4.2. Esteraz aktivitesi tayini

İnhibitörlerin CA enzimi üzerindeki etkisini araştırmak için bu yöntem kullanıldı. Bu yöntem, karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Prensipte 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<sup>+</sup> iyonunun ayrışıp ayrışmaması ölçümü etkilememektedir [50, 71]. Bu dalga boylarındaki *p*-nitro fenil asetatın da çok az absorpsiyonu olduğundan, kör olarak kullanılmaktadır. Tayin işlemlerinde kuvarz küvetlere 1 mL substrat, 1,3 mL tampon, 0,6 mL su ve 0,1 mL enzim konulmasından 3 dakika sonra 25°C'de 348 nm'de absorbansı okundu. Spektrofotometre, daha önce enzim yerine 0,1 mL tampon konularak, karışımın 3 dakika sonraki absorbansı ile sıfıra ayarlandı. Bu suretle; 3 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'lık olup, daha derişigini hazırlamak esterin sınırlı çözünürlüğü sebebiyle mümkün değildir. Aseton ise diğer organik çözücülere oranla hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden

çözücü olduğu için seçildi [72]. Enzim çözeltisinin tamponlanması 0,05 M Tris-SO<sub>4</sub> (pH=7,4) çözeltisiyle yapıldı [73].

## **2.5.5. İnsan eritrositlerinden karbonik anhidraz enzimlerinin saflaştırılması**

### **2.5.5.1. Sepharose - 4B matriksi üzerinde afinite jelinin hazırlanışı**

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 [73].

## **2. 6. Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit CA I Ve CA II Enzimleri Üzerindeki İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi**

### **2. 6. 1. Sentezlenen bileşiklerin İnsan Eritrosit CA I Ve CA II enzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkilerinin *in vitro* olarak incelenmesi**

İnsan eritrositlerinde elde edilen CA I ve CA II enzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerinde bileşiklerin inhibisyon etkileri; glokom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan % 1'lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edilmek suretiyle araştırıldı. Bunun için insan kanından elde edilen CA I ve CA II enzimleri için beş farklı uygun inhibitör konsantrasyonunda hidrataz aktivite ölçümü yapıldı. İnhibisyon etkisi olan bileşiklerin % aktivite-[I] grafikleri çizilerek,  $I_{50}$  değerleri hesaplandı. Bu tablo ve grafiklerdeki [I] değerleri, aktivite ölçüm ortamı için hesaplanan değerlerdir (toplam hacim 4,2 mL).

### **2. 6. 2. Sentezlenen bileşiklerin CA I Ve CA II enzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisinin *in vitro* olarak incelenmesi**

İnsan eritrositlerinde saflaştırılan CA I ve CA II enzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerinde bileşiklerin inhibisyon etkileri; glokom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan % 1'lik-çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edildiği deneylerde beş farklı inhibitör konsantrasyonu için esteraz aktivite ölçümü yapıldı. Her bir bileşik için % Aktivite-[I] grafikleri çizilerek,  $I_{50}$  değerleri hesaplandı. Bu tablo ve grafiklerdeki [I] değerleri, aktivite ölçüm ortamı için hesaplanan değerlerdir (toplam hacim 3 mL).

Bütün esteraz aktivitesi deneylerinde kullanılan ana substrat çözeltisi 3 mM, aktivite ölçüm ortamının toplam hacmi 3 mL olduğundan ve 1 mL substrat çözeltisi kullanıldığından; ortamdaki

substrat konsantrasyonu 1 mM'dır. Aktivite birimi şöyle hesaplandı: 348 nm'de *p*-nitrofenol ve *p*-nitrofenolat iyonunun molar absorpsiyon sabiti ( $\epsilon$ )  $5.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  dir. *p*-Nitrofenil asetatın ise  $0.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  olduğundan; 348 nm'de ölçülen absorbans değerinin 5'e bölümü ile ortamdaki *p*-nitrofenol (*p*-nitrofenolat) iyon konsantrasyonunu mM cinsinden verir [74].

$$p\text{-Nitrofenol konsantrasyonu} = A(O.D)/5 \times 10^3 \text{ M}$$

$$p\text{-Nitrofenol konsantrasyonu} = A(O.D)/5 \text{ mM}$$

Bulunan bu değer 3 dakika için olduğuna göre; 1 dakikada oluşan *p*-nitrofenol miktarını bulmak için 3'e bölünür. Toplam hacim 3 mL olduğundan

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

### 2. 6. 3. Sentezlenen bileşiklerin CA I ve CA II enzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkilerinin $K_i$ sabitleriyle bulunması

$K_i$  değerlerini bulmak için; insan eritrositlerinden afinite kromatografisi yöntemi kullanılarak saflaştırılan CA I ve CA II enzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerinde bileşiklerin inhibisyon etkileri; enzim üzerine tatbik edildiği deneylerde, inhibitörlü ve inhibitörsüz olarak beş farklı substrat konsantrasyonu için esteraz aktivite ölçümleri yapıldı. Esteraz aktivitesi için yukarıda belirtildiği gibi;

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

değeri,  $V$  (hız) değeri olarak alındı. Lineweaver Burk grafiklerini çizmek için bu değerler  $1/V$  değerlerine çevrildi. Aynı zamanda beş farklı substrat-konsantrasyonları  $[S]$ , grafikte kullanmak için  $1/[S]$  değerlerine dönüştürüldü. Bu-değerlerden faydalanılarak her bir inhibitörün CA I ve CA II enzimleri için ayrı ayrı Lineweaver Burk grafikleri çizildi. Bu grafiklerden elde edilen denklemlerden,  $K_M$  ve  $V_{\max}$  değerleri bulundu. Bu değerler yarışmasız inhibitörler için kullanılan eşitlikte yerine konularak  $K_i$  değerleri hesaplandı.

$$V_{\max}^i = \frac{V_{\max}}{1 + [I] / K_i}$$

### 3. ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 3. 1. CA Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması Sonuçları

Jelin kolona yerleştirilmesi, tamponla dengelenmesi sonra insan kanından elde edilen hemolizat katı trisle pH'sı 8,7'ye getirildi. Hemolizat kolona direk olarak tatbik edildi. Tatbik etme işlemi bittikten sonra kolon yıkama tamponundan geçirildi. Yıkama işlemi kanın rengi gidinceye ve köre (yıkama tamponuna) karşı 280 nm'de 0,08 A veya 0,05 A değerine kadar devam etti. Bu değere ulaşıldığında CA I için hazırlanan tampon (pH=6,3) ile elüe edildi. Elüatlar 5 mL'lik fraksiyonlar halinde toplanarak, her tüpteki numune için 280 nm'de kalitatif protein tayini yapıldı. Elüsyon değerlerinin absorbansı belli bir yükselme ve düşme gerçekleştikten sonra kesildi. Absorbans gösteren tüplerde CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesine bakıldı.

İnsan eritrositlerinden saflaştırılan CA I ve CA II enzimleri için Bradford (coomassie blue) yöntemiyle protein tayini ve hidrataz aktivitesi tayini yapıldı. Enzimlerin aktivite ölçümü 1 mM substrat konsantrasyonunda ve 100 µL enzim çözeltisi ile yapılmıştır. Protein tayinleri ise, 100 µL enzim çözeltisi için ölçülmüştür. Hemolizatlarda ise aktivite ve protein miktarı ölçümünde; her bir hemolizattan 1 mL alınıp, 10 mL'ye seyreltilmiş ve bundan 100 µL alınarak ölçümler yapılmıştır.

İnsan kanından hazırlanan hemolizat için protein miktarı 95 mg/mL ve hidrataz aktivitesi 1437 EU/mL bulundu ve buradan spesifik aktivite,

$$(SA) = 2200/135 = 16,29 \text{ olarak bulundu.}$$

Saflaştırılan CA I ve CA II için Comassie blue yöntemi kullanılarak protein miktarı ve hidratz aktiviteleri hesaplandı..

HCA I için protein miktarı 0,54 mg/ml      hidrataz aktivitesi      265 EU

HCA II için protein miktarı 0,35 mg /ml      hidrataz aktivitesi      243 EU

Saf enzimlerin aktivite ölçümünde 100 kat seyreltme yapıldığından aktivitesi CA I için 26500 EU/mL, CA II için 24300 EU/mL olarak bulundu.

Buna göre;

$$\text{HCA I için spesifik aktivite (SA)} = 26500/0,54 = 49074$$

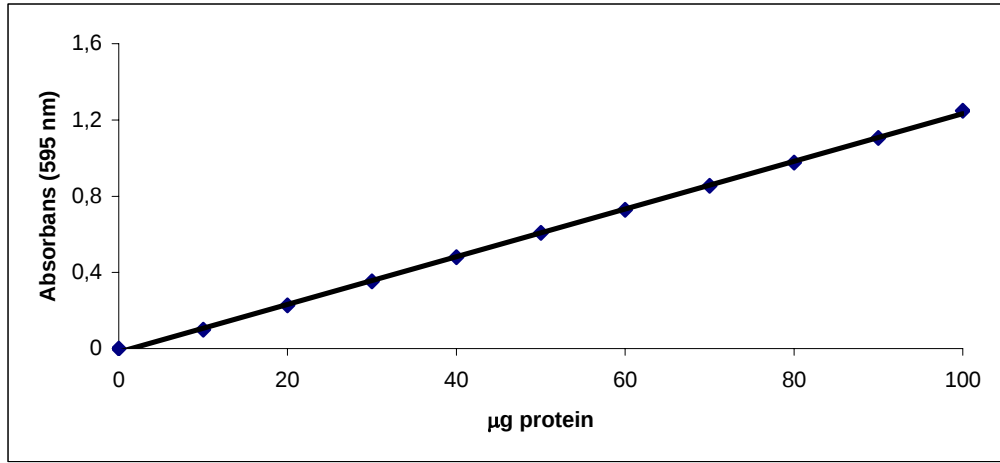
$$\text{HCA II için spesifik aktivite (SA)} = 24300/0,35 = 69428$$

Bu değerlere göre, hemolizatın doğrudan afinite kolonuna uygulanması sonucu;

CA I  $49074/16,29 = 3012,5$  kat saflaştırılmış oldu.

CA II  $69428/16,29 = 4262$  kat saflaştırılmış oldu.

Kantitatif protein tayini Bradford yöntemi ile yapıldı. Bu yöntem için önceden çalışılmış standart bir eğriden yararlanıldı. 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  $\mu\text{g}$  protein miktarları bulundu.



**şekil 8.** Bradford yöntemiyle protein tayini için kullanılan standart grafik.

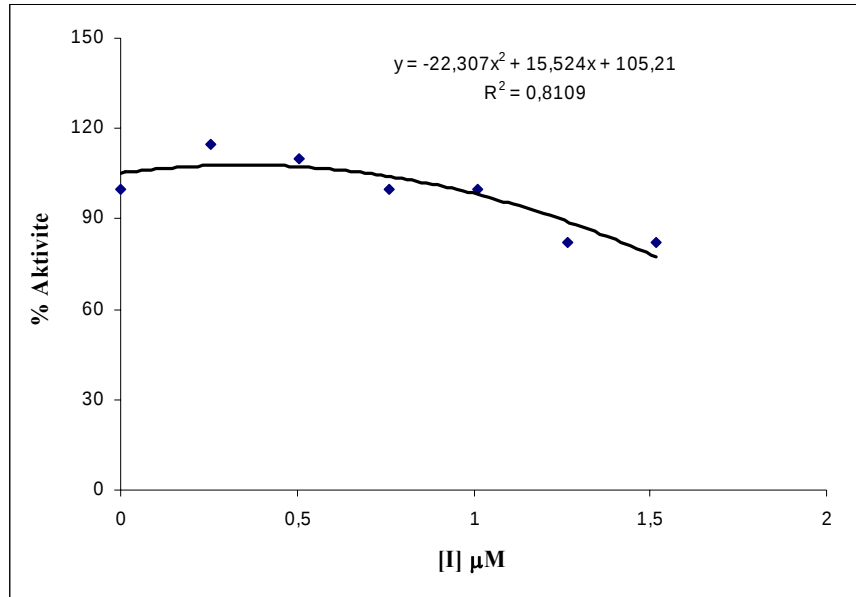
### 3. 2. Sentezlenen Bileşiklerin İnsan Eritrosit CA Enzimleri zerinde İnhibisyon Etkilerinin in vitro Olarak İncelenmesi

#### 3. 2. 1 Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA enziminin hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkilerinin in vitro olarak incelenmesi.

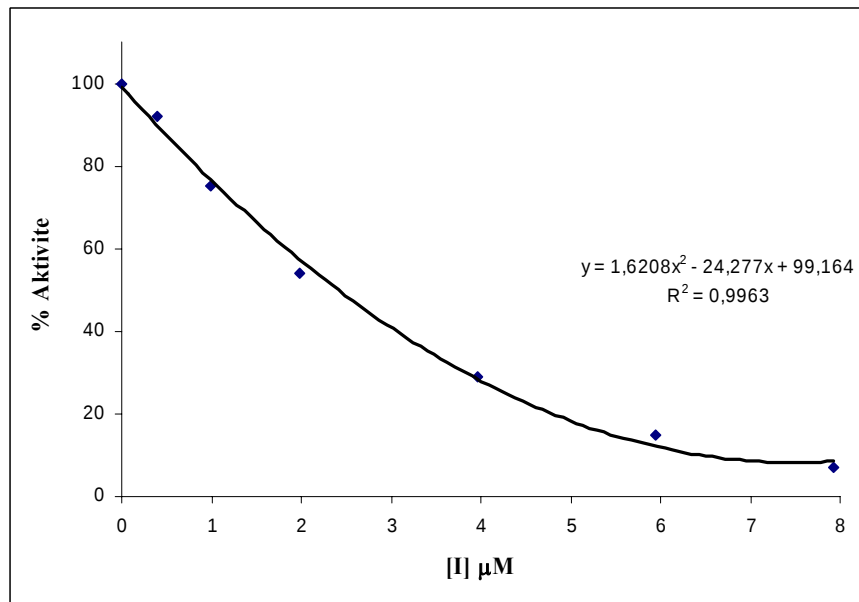
İnsan eritrosit CA I ve CA II enzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerinde bileşiklerin inhibisyon etkileri; glokom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan %1'lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edilmek suretiyle araştırıldı. Bunun için insan kanından elde edilen CA I ve CA II enzimleri için beş farklı uygun inhibitör konsantrasyonunda hidrataz aktivite ölçümü yapıldı. İnhibisyon etkisi olan bileşiklerin % Aktivite-[I] grafikleri çizilerek,  $I_{50}$  değerleri hesaplandı. Bu tablo ve grafiklerdeki [I] değerleri, aktivite lm ortamı için hesaplanan değerlerdir ( toplam hacim 4.2 mL ).

**Çizelge 1.** HCA-I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine Glukan, Lektin, Linoleik Asit, Beta Karoten bileşiklerinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

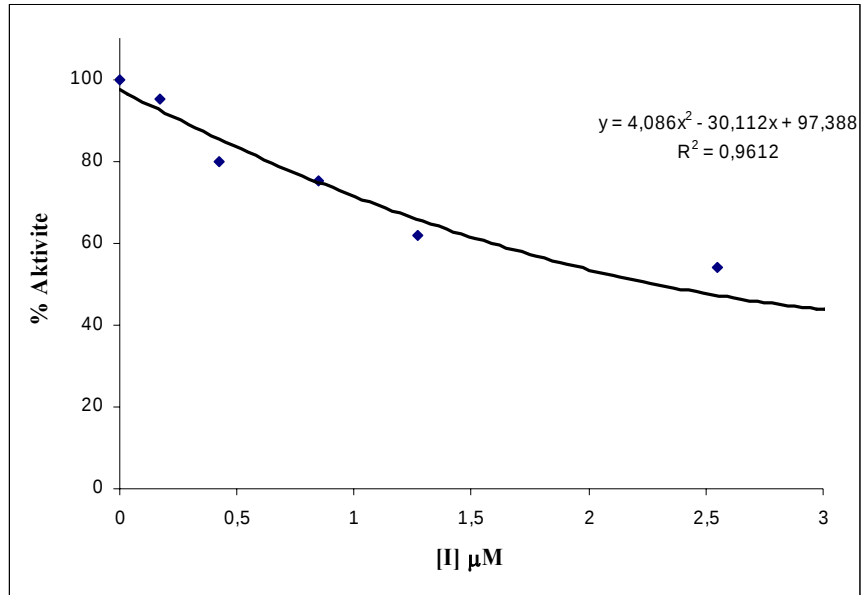
| İnhibitör        | Veronal<br>Tamponu<br>(mL) | Brom<br>Timol<br>(µL) | Enzim<br>(µL) | İnhibitör<br>(µL) | Destile<br>su<br>(µl) | Doygun<br>CO <sub>2</sub><br>Çözeltisi<br>(mL) | %<br>Aktivite | [I]<br>M |
|------------------|----------------------------|-----------------------|---------------|-------------------|-----------------------|------------------------------------------------|---------------|----------|
| Glukan           | 1                          | 100                   | -             | -                 | 600                   | 2,5                                            | -             | -        |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | -                 | 500                   | 2,5                                            | 100           | 0        |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 50                | 450                   | 2,5                                            | 128,125       | 0,253    |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 100               | 400                   | 2,5                                            | 81,25         | 0,506    |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 150               | 450                   | 2,5                                            | 100           | 0,759    |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 200               | 400                   | 2,5                                            | 100           | 1,012    |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 250               | 350                   | 2,5                                            | 81,25         | 1,265    |
| Lektin           | 1                          | 100                   | -             | -                 | 600                   | 2,5                                            | -             | -        |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | -                 | 500                   | 2,5                                            | 100           | 0        |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 20                | 480                   | 2,5                                            | 47,87         | 0,396    |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 50                | 450                   | 2,5                                            | 75,67         | 0,992    |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 100               | 400                   | 2,5                                            | 75,67         | 1,984    |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 200               | 300                   | 2,5                                            | 59,45         | 3,968    |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 300               | 250                   | 2,5                                            | 59,45         | 5,952    |
| Linoleik<br>Asit | 1                          | 100                   | -             | -                 | 600                   | 2,5                                            | -             | -        |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | -                 | 500                   | 2,5                                            | 100           | 0        |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 20                | 480                   | 2,5                                            | 53,06         | 0,16     |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 50                | 450                   | 2,5                                            | 45,23         | 0,42     |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 100               | 400                   | 2,5                                            | 45,23         | 0,84     |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 150               | 350                   | 2,5                                            | 39,15         | 1,27     |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 300               | 200                   | 2,5                                            | 4,16          | 2,54     |
| Beta<br>Karoten  | 1                          | 100                   | -             | -                 | 600                   | 2,5                                            | -             | -        |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | -                 | 500                   | 2,5                                            | 100           | 0        |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 20                | 480                   | 2,5                                            | 73,21         | 0,088    |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 50                | 450                   | 2,5                                            | 100           | 0,22     |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 100               | 400                   | 2,5                                            | 100           | 0,44     |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 150               | 350                   | 2,5                                            | 100           | 0,66     |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 200               | 300                   | 2,5                                            | 100           | 0,88     |



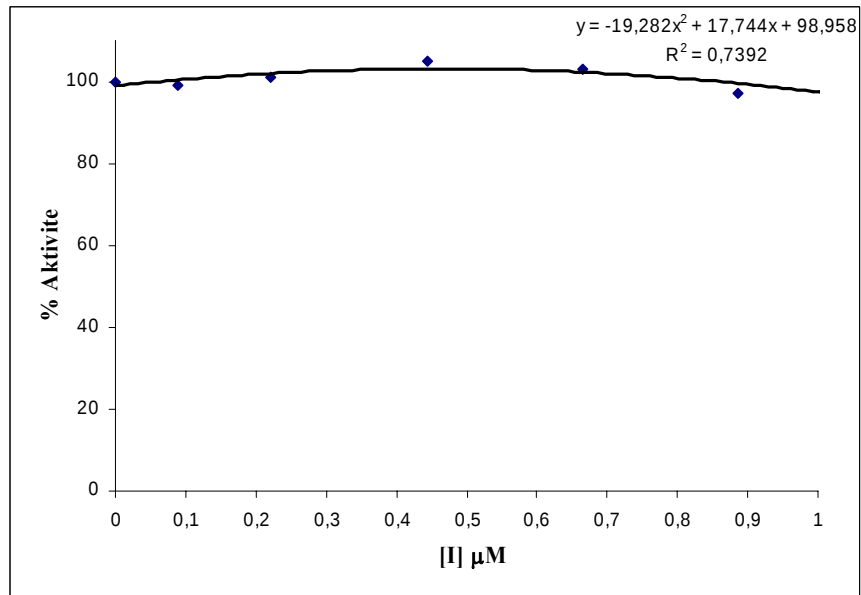
**Şekil 9.** İnsan Eritrosit CA I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine glukoz bileşiğinin etkisi



**Şekil 10.** İnsan Eritrosit CA I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine lektin bileşiğinin etkisi



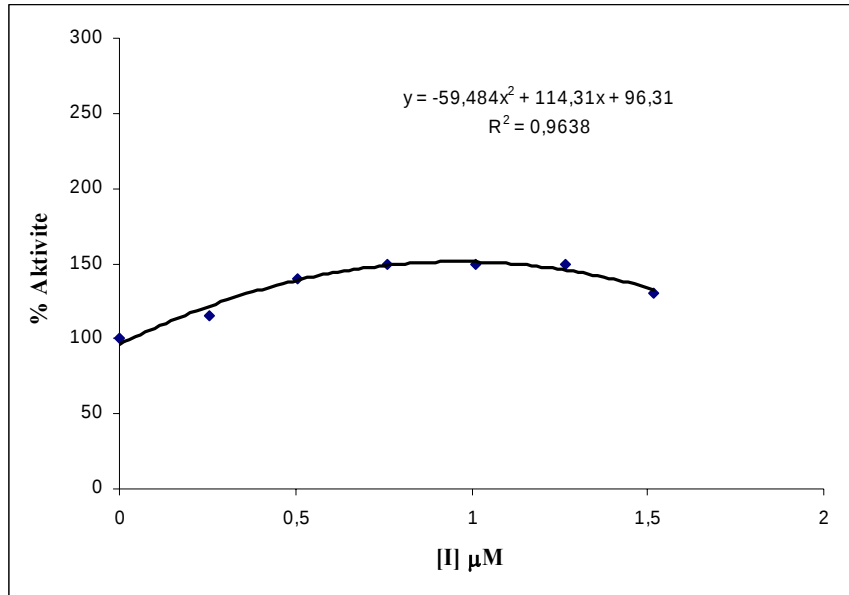
**Şekil 11.** İnsan Eritrosit CA I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine linoleik asit bileşiğinin etkisi



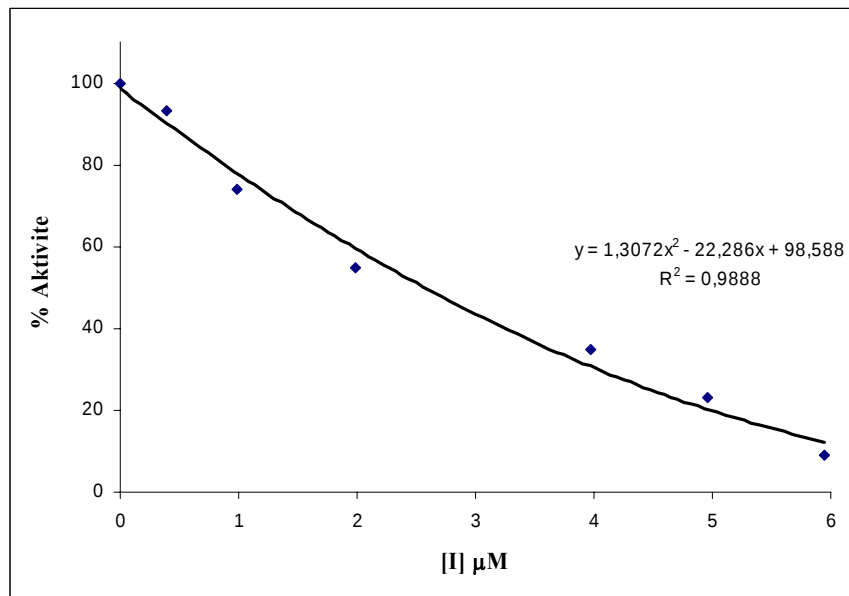
**Şekil 12.** İnsan Eritrosit CA I enziminin hidrataz aktivitesi üzerine beta karoten bileşiğinin etkisi.

**Çizelge 2.** HCA-II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine Glukan, Lektin, Linoleik Asit, Beta Karoten bileşiklerinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar

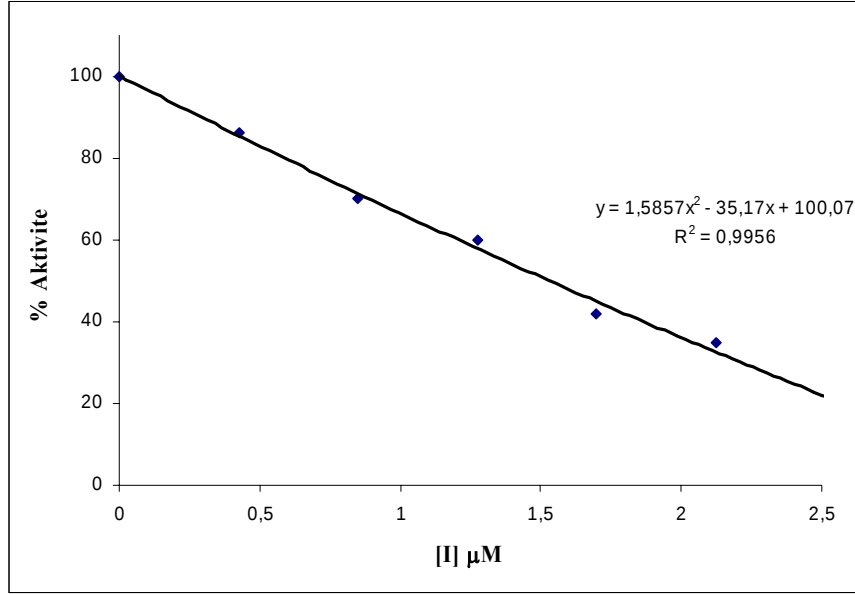
| İnhibitör        | Veronal<br>Tamponu<br>(mL) | Brom<br>Timol<br>(μL) | Enzim<br>(μL) | İnhibitör<br>(μL) | Destile<br>su<br>(μl) | Doygun<br>CO <sub>2</sub><br>Çözeltisi<br>(mL) | %<br>Aktivite | [I]<br>M |
|------------------|----------------------------|-----------------------|---------------|-------------------|-----------------------|------------------------------------------------|---------------|----------|
| Glukan           | 1                          | 100                   | -             | -                 | 600                   | 2,5                                            | -             | -        |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | -                 | 500                   | 2,5                                            | 100           | 0        |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 50                | 450                   | 2,5                                            | 153,4         | 0,25     |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 100               | 400                   | 2,5                                            | 153,4         | 0,50     |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 150               | 450                   | 2,5                                            | 313,6         | 0,75     |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 200               | 400                   | 2,5                                            | 153,4         | 1,01     |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 250               | 350                   | 2,5                                            | 153,4         | 1,26     |
| Lektin           | 1                          | 100                   | -             | -                 | 600                   | 2,5                                            | -             | -        |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | -                 | 500                   | 2,5                                            | 100           | 0        |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 20                | 480                   | 2,5                                            | 61,5          | 0,39     |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 50                | 450                   | 2,5                                            | 87,5          | 0,99     |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 100               | 400                   | 2,5                                            | 100           | 1,98     |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 200               | 300                   | 2,5                                            | 87,5          | 3,96     |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 250               | 250                   | 2,5                                            | 87,5          | 4,96     |
| Linoleik<br>Asit | 1                          | 100                   | -             | -                 | 600                   | 2,5                                            | -             | -        |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | -                 | 500                   | 2,5                                            | 100           | 0        |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 50                | 450                   | 2,5                                            | 100           | 0,42     |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 100               | 400                   | 2,5                                            | 100           | 0,84     |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 150               | 350                   | 2,5                                            | 100           | 1,27     |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 200               | 3000                  | 2,5                                            | 153,4         | 1,69     |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 250               | 250                   | 2,5                                            | 153,4         | 2,12     |
| Beta<br>Karoten  | 1                          | 100                   | -             | -                 | 600                   | 2,5                                            | -             | -        |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | -                 | 500                   | 2,5                                            | 100           | 0        |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 20                | 480                   | 2,5                                            | 73,21         | 0,088    |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 50                | 450                   | 2,5                                            | 100           | 0,22     |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 100               | 400                   | 2,5                                            | 100           | 0,44     |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 150               | 350                   | 2,5                                            | 100           | 0,66     |
|                  | 1                          | 100                   | 100           | 200               | 300                   | 2,5                                            | 100           | 0,88     |



**Şekil 13.** İnsan Eritrosit CA II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine glukoz bileşiğinin etkisi



**Şekil 14.** İnsan Eritrosit CA II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine lektin bileşiğinin etkisi



**Şekil 15.** İnsan Eritrosit CA II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine linoleik asit bileşiğinin etkisi

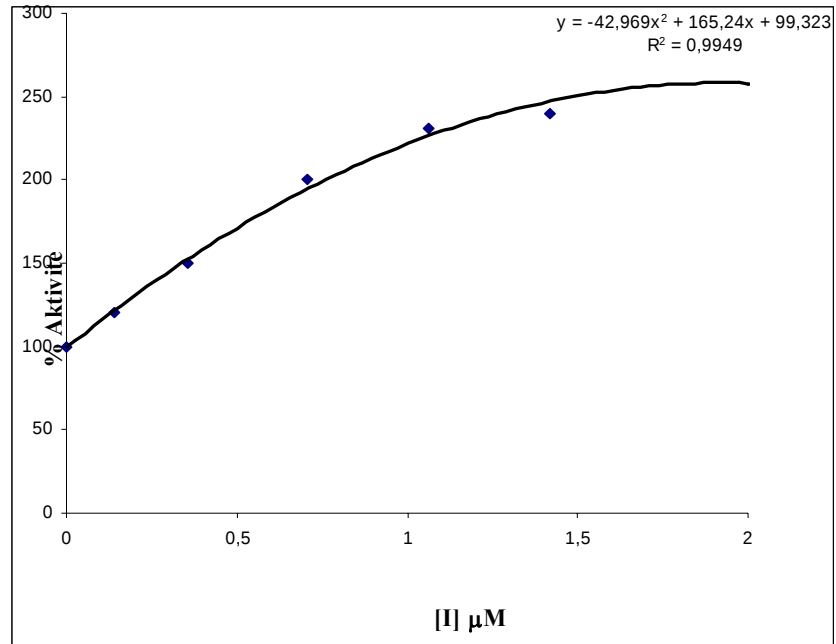
İnsan Eritrosit CA II enziminin hidrataz aktivitesi üzerine beta karoten bileşiğinin etkisi olmadığı gözlemlendi.

#### 4. 3. 2 Sentezlenen bileşiklerin insan eritrosit CA I ve CA II enzimlerinin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisinin İn Vitro olarak incelenmesi

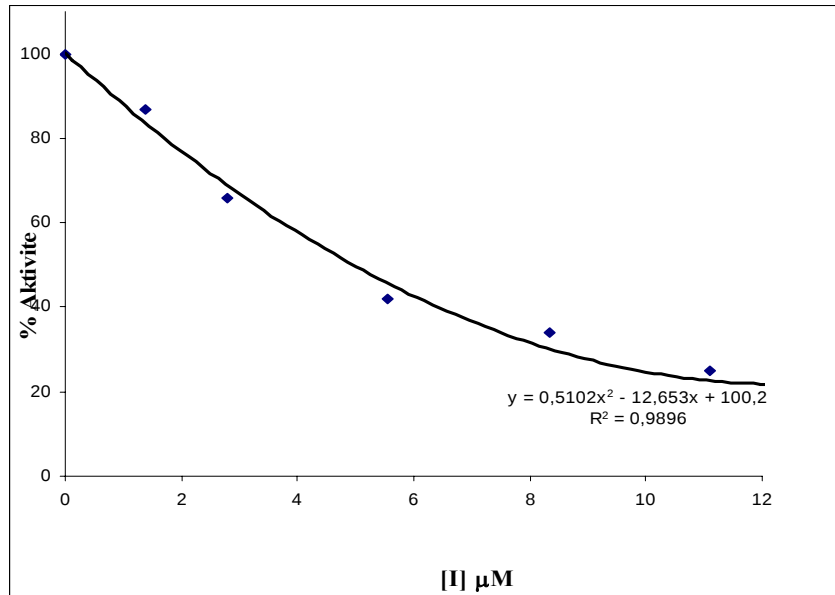
CA I ve CA II'nin esteraz aktivitesi üzerinde bileşiklerin inhibisyon etkileri; glokom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan % 1'lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edilmiştir. Bu amaçla insan kanından elde edilen CA I ve CA II enzimleri için beş farklı inhibitör konsantrasyonunda esteraz aktivite ölçümü yapılmıştır. Her bir bileşik için %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek,  $I_{50}$  değerleri hesaplanmıştır. Bu tablo ve grafiklerdeki [I] değerleri, aktivite ölçüm ortamı için hesaplanan değerlerdir.

**Çizelge 3.** HCA-I enziminin esteraz aktivitesi üzerine Glukan, Lektin, Linoleik Asit, Beta Karoten bileşiklerinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar.

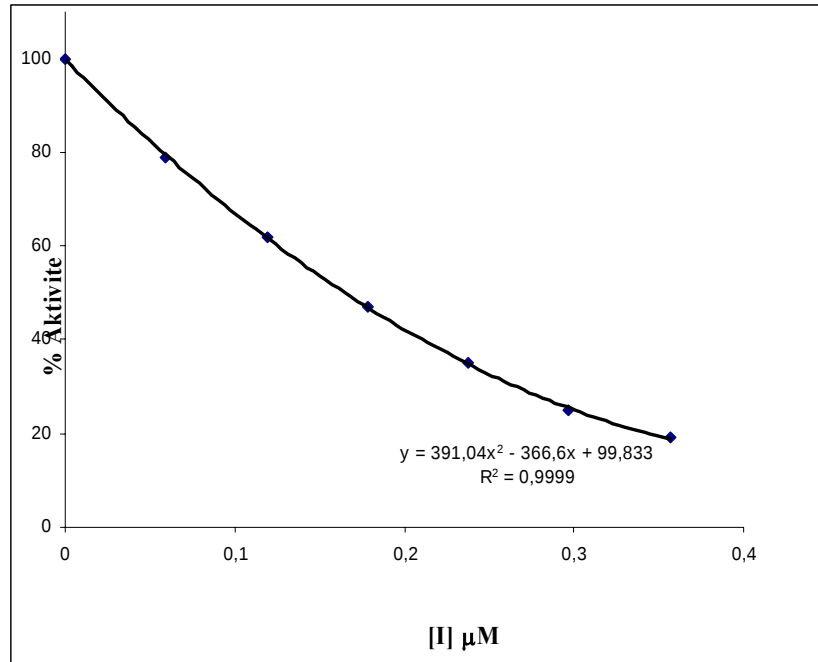
| <b>İnhibitör</b> | <b>Substrat<br/>(mL)</b> | <b>SO<sub>4</sub><br/>Tris-<br/>Tampon<br/>(mL)</b> | <b>Enzim<br/>(mL)</b> | <b>İnhibitör<br/>(µL)</b> | <b>Destile su<br/>(µL)</b> | <b>%<br/>Aktivite</b> | <b>[I]<br/>(µM)</b> |
|------------------|--------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------|---------------------|
| Glukan           | 1                        | 1,3                                                 | 0,1                   | -                         | 600                        | 100                   | 0                   |
|                  | 1                        | 1,3                                                 | 0,1                   | 20                        | 580                        | 151,72                | 0,14                |
|                  | 1                        | 1,3                                                 | 0,1                   | 50                        | 550                        | 217,24                | 0,35                |
|                  | 1                        | 1,3                                                 | 0,1                   | 100                       | 500                        | 231,03                | 0,70                |
|                  | 1                        | 1,3                                                 | 0,1                   | 150                       | 450                        | 186,20                | 1,06                |
|                  | 1                        | 1,3                                                 | 0,1                   | 200                       | 400                        | 231,03                | 1,41                |
| Lektin           | 1                        | 1,3                                                 | 0,1                   | -                         | 600                        | 100                   | 0                   |
|                  | 1                        | 1,3                                                 | 0,1                   | 50                        | 550                        | 89,71                 | 1,38                |
|                  | 1                        | 1,3                                                 | 0,1                   | 100                       | 500                        | 72                    | 2,77                |
|                  | 1                        | 1,3                                                 | 0,1                   | 200                       | 400                        | 57,71                 | 5,55                |
|                  | 1                        | 1,3                                                 | 0,1                   | 300                       | 300                        | 53,14                 | 8,33                |
|                  | 1                        | 1,3                                                 | 0,1                   | 400                       | 200                        | 27,42                 | 11,11               |
| Linoleik Asit    | 1                        | 1,3                                                 | 0,1                   | -                         | 600                        | 100                   | 0                   |
|                  | 1                        | 1,3                                                 | 0,1                   | 5                         | 595                        | 86,56                 | 0,059               |
|                  | 1                        | 1,3                                                 | 0,1                   | 10                        | 590                        | 73,13                 | 0,118               |
|                  | 1                        | 1,3                                                 | 0,1                   | 15                        | 585                        | 53,73                 | 0,178               |
|                  | 1                        | 1,3                                                 | 0,1                   | 20                        | 580                        | 37,31                 | 0,232               |
|                  | 1                        | 1,3                                                 | 0,1                   | 25                        | 475                        | 29,85                 | 0,297               |
| Beta Karoten     | 1                        | 1,3                                                 | 0,1                   | -                         | 600                        | 100                   | 0                   |
|                  | 1                        | 1,3                                                 | 0,1                   | 50                        | 550                        | 86,48                 | 0,310               |
|                  | 1                        | 1,3                                                 | 0,1                   | 100                       | 505                        | 68,91                 | 0,620               |
|                  | 1                        | 1,3                                                 | 0,1                   | 150                       | 450                        | 64,86                 | 0,931               |
|                  | 1                        | 1,3                                                 | 0,1                   | 200                       | 400                        | 51,35                 | 1,241               |
|                  | 1                        | 1,3                                                 | 0,1                   | 300                       | 300                        | 47,29                 | 1,862               |



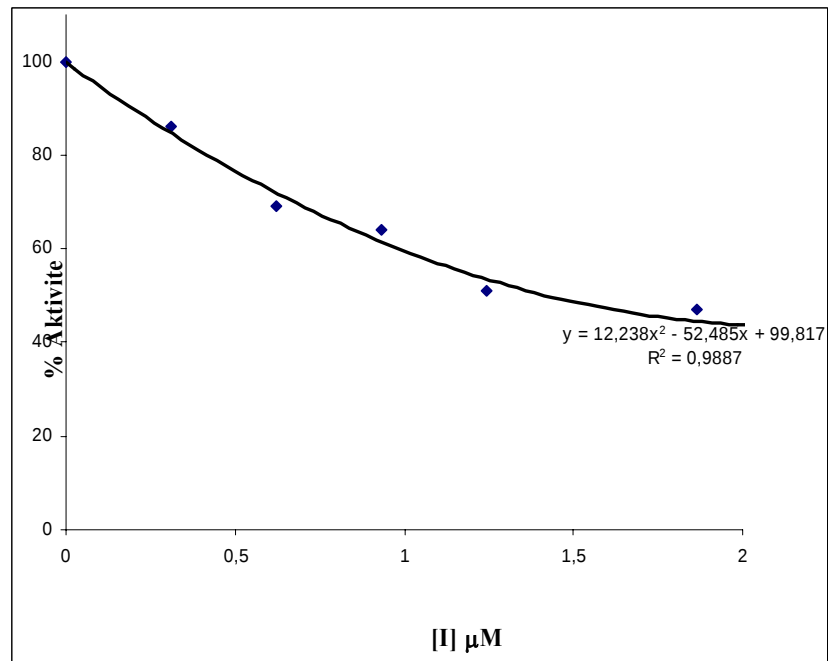
**Şekil 16.** İnsan Eritrosit CA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine glukoz bileşiğinin etkisi



**Şekil 17.** İnsan Eritrosit CA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine lektin bileşiğinin etkisi



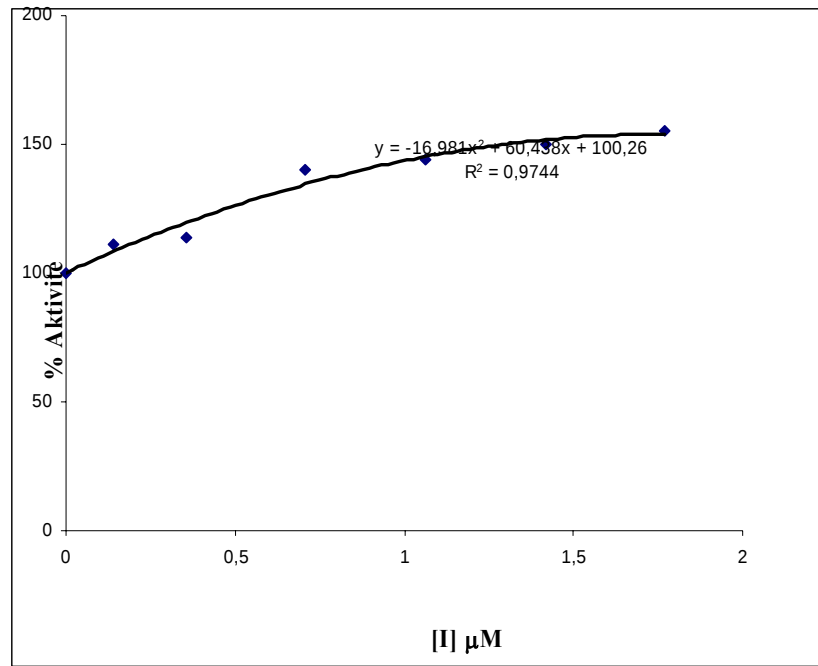
**Şekil 18.** İnsan Eritrosit CA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine linoleik asit bileşiğinin etkisi



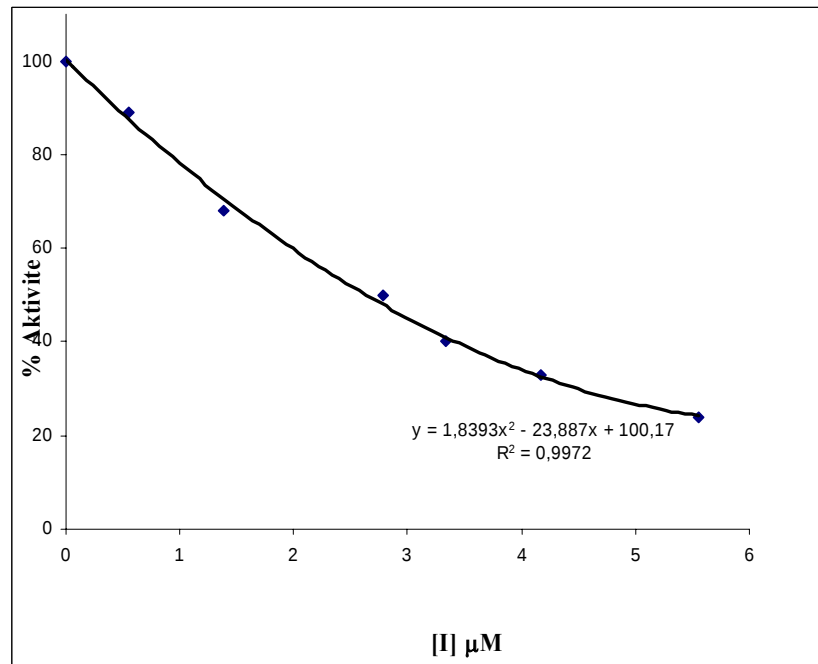
**Şekil 19.** İnsan Eritrosit CA I enziminin esteraz aktivitesi üzerine beta karoten bileşiğinin etkisi

**Çizelge 4.** HCA-II enziminin esteraz aktivitesi üzerine Glukan, Lektin, Linoleik Asit, Beta Karoten bileşiklerinin in vitro inhibisyon etkilerini incelemek üzere yapılan işlemler ve elde edilen sonuçlar

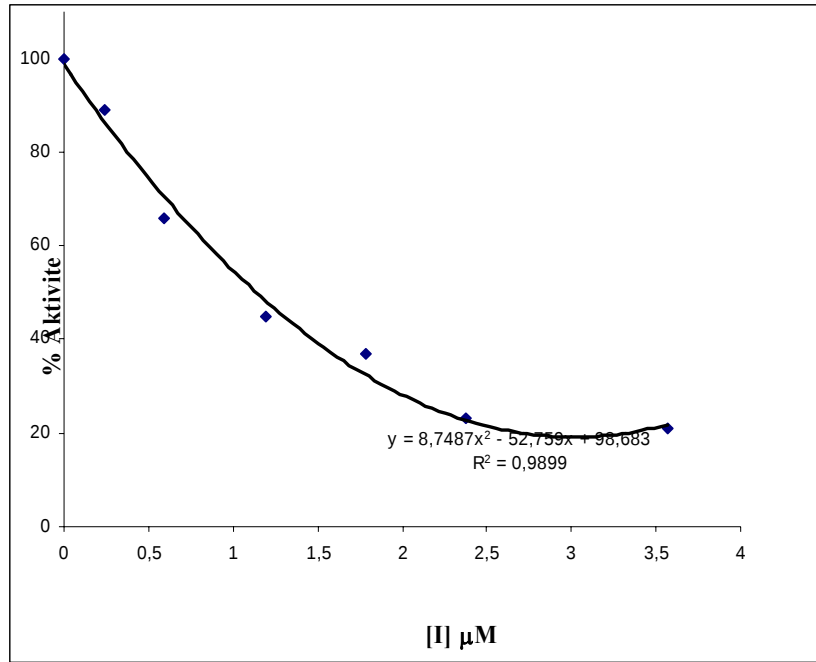
| İnhibitör     | Substrat<br>(mL) | SO <sub>4</sub><br>Tris-<br>Tampon<br>(mL) | Enzim<br>(mL) | İnhibitör<br>(µL) | Destile su<br>(µL) | %<br>Aktivite | [I]<br>(µM) |
|---------------|------------------|--------------------------------------------|---------------|-------------------|--------------------|---------------|-------------|
| Glukan        | 1                | 1,3                                        | 0,1           | -                 | 600                | 100           | 0           |
|               | 1                | 1,3                                        | 0,1           | 20                | 580                | 114,90        | 0,141       |
|               | 1                | 1,3                                        | 0,1           | 50                | 550                | 111,05        | 0,354       |
|               | 1                | 1,3                                        | 0,1           | 100               | 500                | 142,30        | 0,708       |
|               | 1                | 1,3                                        | 0,1           | 150               | 450                | 144,2         | 1,062       |
|               | 1                | 1,3                                        | 0,1           | 200               | 400                | 133,65        | 1,417       |
| Lektin        | 1                | 1,3                                        | 0,1           | -                 | 600                | 100           | 0           |
|               | 1                | 1,3                                        | 0,1           | 20                | 580                | 83,33         | 0,55        |
|               | 1                | 1,3                                        | 0,1           | 50                | 550                | 72,22         | 1,3         |
|               | 1                | 1,3                                        | 0,1           | 100               | 500                | 53,70         | 2,77        |
|               | 1                | 1,3                                        | 0,1           | 120               | 480                | 46,29         | 3,33        |
|               | 1                | 1,3                                        | 0,1           | 150               | 450                | 29,62         | 4,166       |
| Linoleik Asit | 1                | 1,3                                        | 0,1           | -                 | 600                | 100           | 0           |
|               | 1                | 1,3                                        | 0,1           | 20                | 580                | 74,32         | 0,237       |
|               | 1                | 1,3                                        | 0,1           | 50                | 550                | 69,81         | 0,594       |
|               | 1                | 1,3                                        | 0,1           | 100               | 500                | 58,55         | 1,188       |
|               | 1                | 1,3                                        | 0,1           | 150               | 450                | 51,35         | 1,782       |
|               | 1                | 1,3                                        | 0,1           | 200               | 400                | 36,48         | 2,377       |
| Beta Karoten  | 1                | 1,3                                        | 0,1           | -                 | 600                | 100           | 0           |
|               | 1                | 1,3                                        | 0,1           | 50                | 550                | 80,24         | 0,310       |
|               | 1                | 1,3                                        | 0,1           | 80                | 520                | 66,04         | 0,496       |
|               | 1                | 1,3                                        | 0,1           | 120               | 480                | 61,72         | 0,74        |
|               | 1                | 1,3                                        | 0,1           | 150               | 450                | 54,32         | 0,93        |
|               | 1                | 1,3                                        | 0,1           | 200               | 400                | 42,59         | 1,241       |



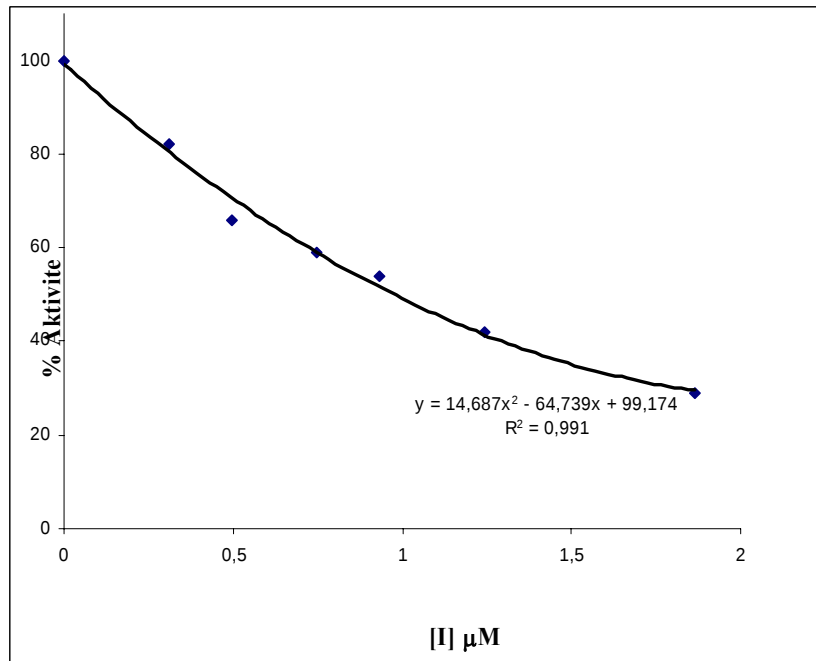
**Şekil 20.** İnsan Eritrosit CA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine glukan bileşiğinin etkisi



**Şekil 21.** İnsan Eritrosit CA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine lektin bileşiğinin etkisi



**Şekil 22.** İnsan Eritrosit CA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine linoleik asit bileşiğinin etkisi



**Şekil 23.** İnsan Eritrosit CA II enziminin esteraz aktivitesi üzerine beta karoten bileşiğinin etkisi

Bileşiklerin eritrosit CA I ve CA II enzimlerinin CO<sub>2</sub> hidrataz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisinin araştırılmasına yönelik yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlardan Şekil 5. 4, 5. 5, 5. 6, 5.7, 5.8, 5.9 ,5.10, 5.11'deki grafiklerden hesaplanan I<sub>50</sub> değerleri toplu olarak çizelge 17'de verilmiştir.

**Çizelge 5.** Bileşiklerin CA I ve CA II enzimlerinin in vitro CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları

| I <sub>50</sub> (µM) |               |               |
|----------------------|---------------|---------------|
| İnhibitör            | CA I          | CA II         |
| Beta D- Glukan       | Aktive ediyor | Aktive Ediyor |
| Lektin               | 2,41          | 2,52          |
| Linoleik Asit        | 2,3           | 1,48          |
| Beta Karoten         | -             | -             |

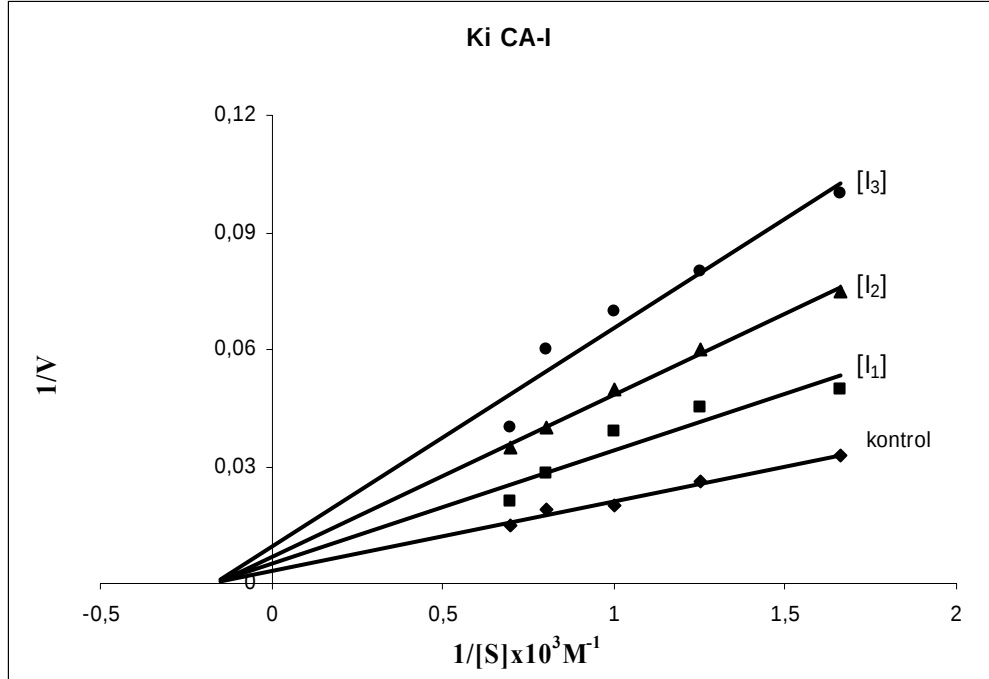
Bileşiklerin eritrosit CA I ve CA II enzimlerinin esteraz aktiviteleri üzerinde inhibisyon etkisinin araştırılmasına yönelik yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlardan Şekil 5. 12, 5. 13, 5. 14, 5. 15,5.16,5.17, 5.18, 5.19'deki grafiklerden hesaplanan I<sub>50</sub> değerleri toplu olarak çizelge 18'de verilmiştir.

**Çizelge 6.** Bileşiklerin CA I ve CA II enzimlerinin in vitro esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi sonuçları

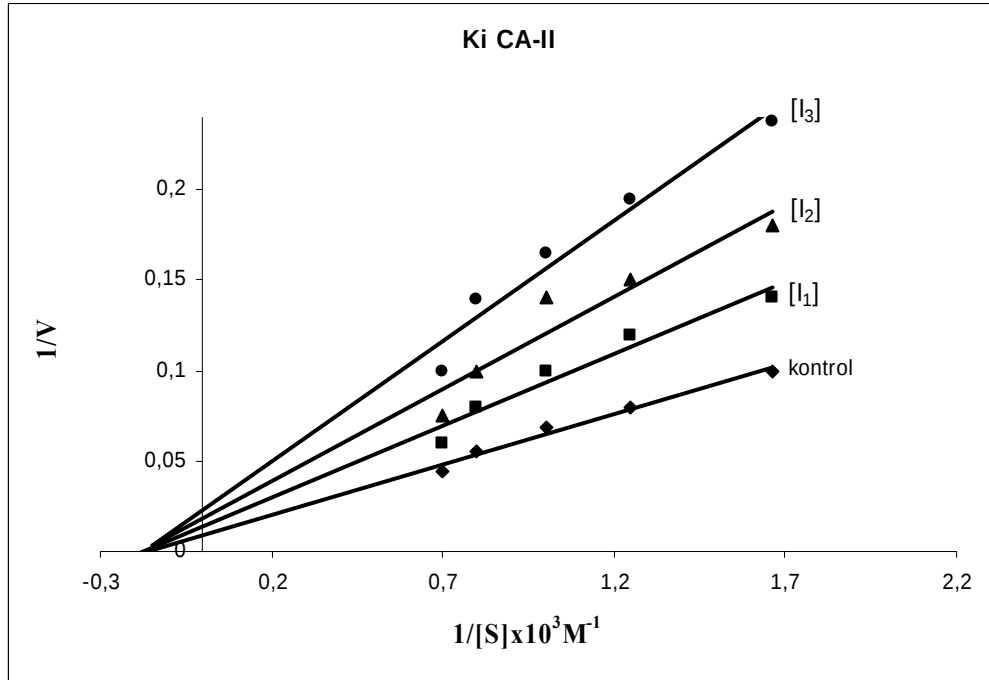
| I <sub>50</sub> (µM) |               |               |
|----------------------|---------------|---------------|
| İnhibitör            | CA I          | CA II         |
| Beta D- Glukan       | Aktive ediyor | Aktive Ediyor |
| Lektin               | 4,9           | 2,7           |
| Linoleik Asit        | 0,17          | 1,2           |
| Beta Karoten         | 1,45          | 0,92          |

#### **5. 4 Bileşiklerin İnsan Eritrosit Karbonik Anhidraz Enzimlerinin Esteraz Aktivitesi Üzerindeki İnhibisyon Etkisi Çalışmalarından $K_i$ Sabitlerinin Bulunması**

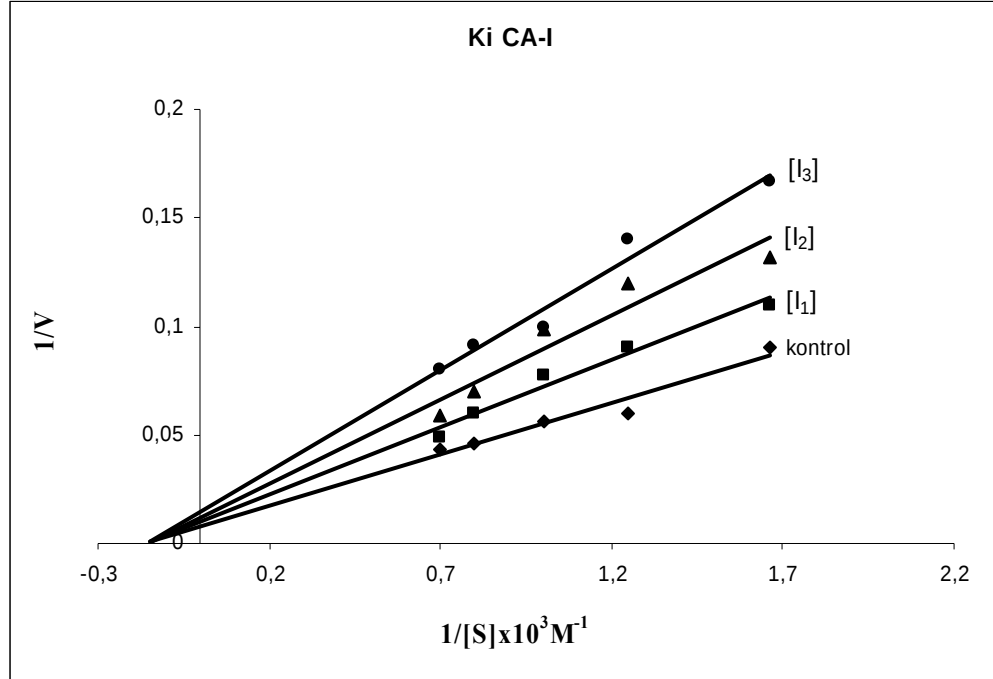
İnhibitör çalışmaları için Beta D- glukoz, lektin, linoleik asit, beta karoten bileşiklerini kullandık. Bunun için inhibitörsüz ve inhibitörlü ortamda beş farklı substrat konsantrasyonunda aktiviteler belirlendi. Bu amaçla 4. 5. 2 ve 4. 5. 3 bölümlerinde anlatıldığı şekilde hazırlanan 3 mM'lık p-nitrofenilasetat çözeltisinden istenilen konsantrasyonu sağlayacak şekilde tüplere 5 farklı miktarda ilave edildi. Bütün tüplerin toplam hacmi 1,9 mL olacak şekilde saf su veya inhibitör çözeltisi eklendi. Daha sonra her tüpe 1 mL 0,05 M Tris-SO<sub>4</sub> (pH=7,4) ve 0.1 mL enzim ilave edilip, 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 348 nm'de köre karşı absorbans değeri ölçüldü. Kullanılan çözelti miktarları ve buna karşılık gelen substrat ve inhibitör konsantrasyonları çizelgede verilmektedir. İnhibitörlü ve inhibitörsüz ortamlarda değişik substrat konsantrasyonlarında 348 nm'de ölçülen absorbans değerleri, kullanılan aktivite birimi (reaksiyon hızı)  $\mu\text{mol/dakika}$  cinsinden bölüm 4. 5. 2'de belirtildiği şekilde bulundu. Bütün inhibitörler için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu ve 5 farklı substrat konsantrasyonunda elde edilen aktivite değerleri kullanılarak;  $1/V-I/S$  değerleri hesaplandı. Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek  $K_i$  değerleri hesaplandı.



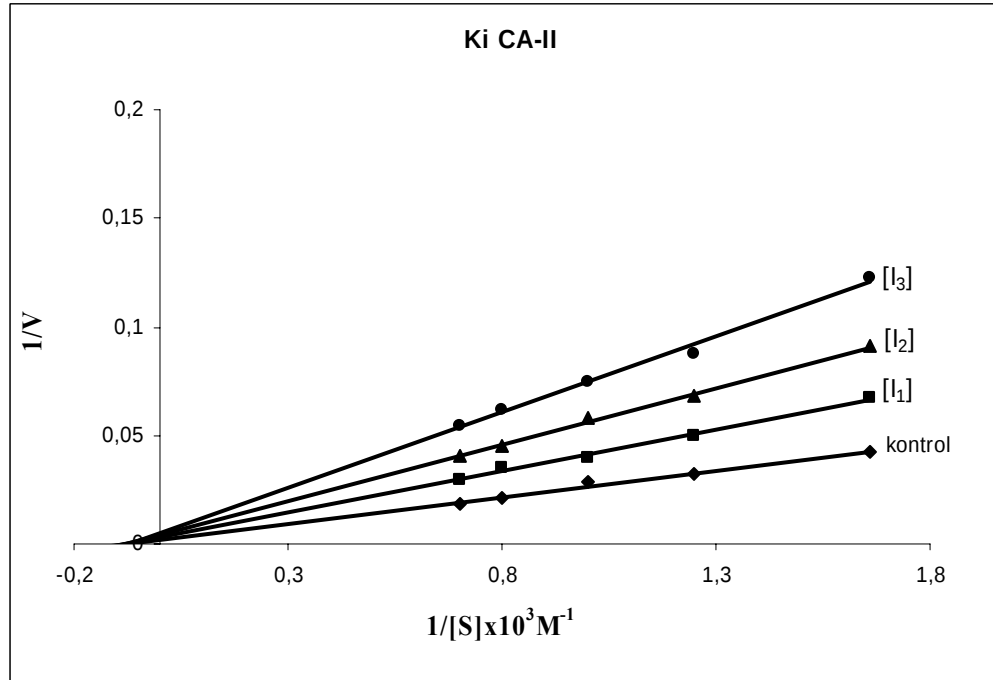
**Şekil 24.** İnsan Eritrosit CA I enzimi üzerinde Lektin bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği



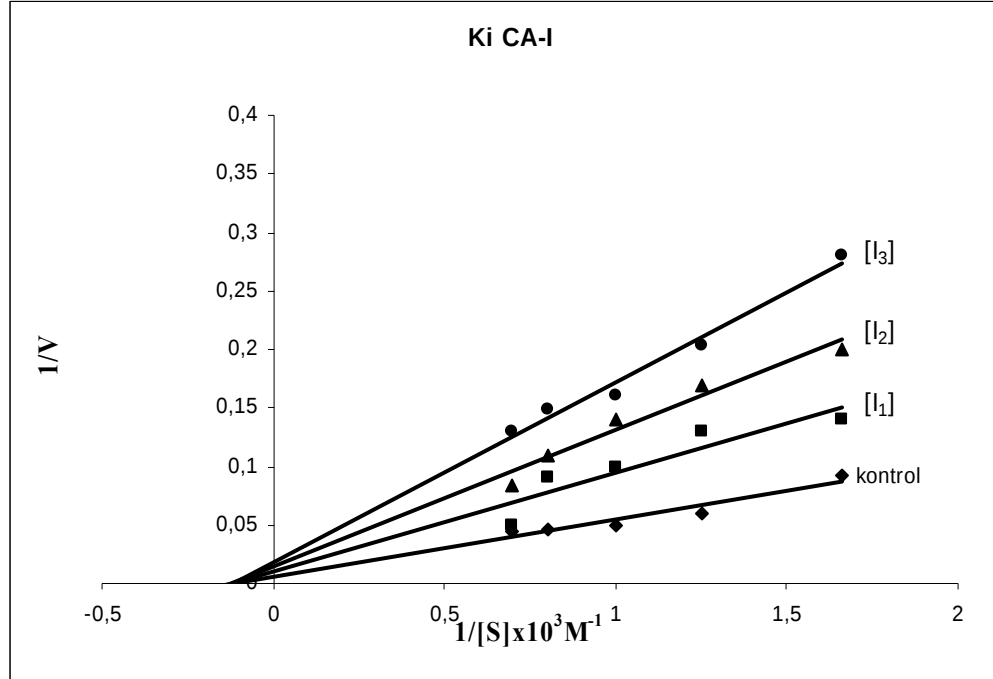
**Şekil 25.** İnsan Eritrosit CA II enzimi üzerinde Lektin bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği



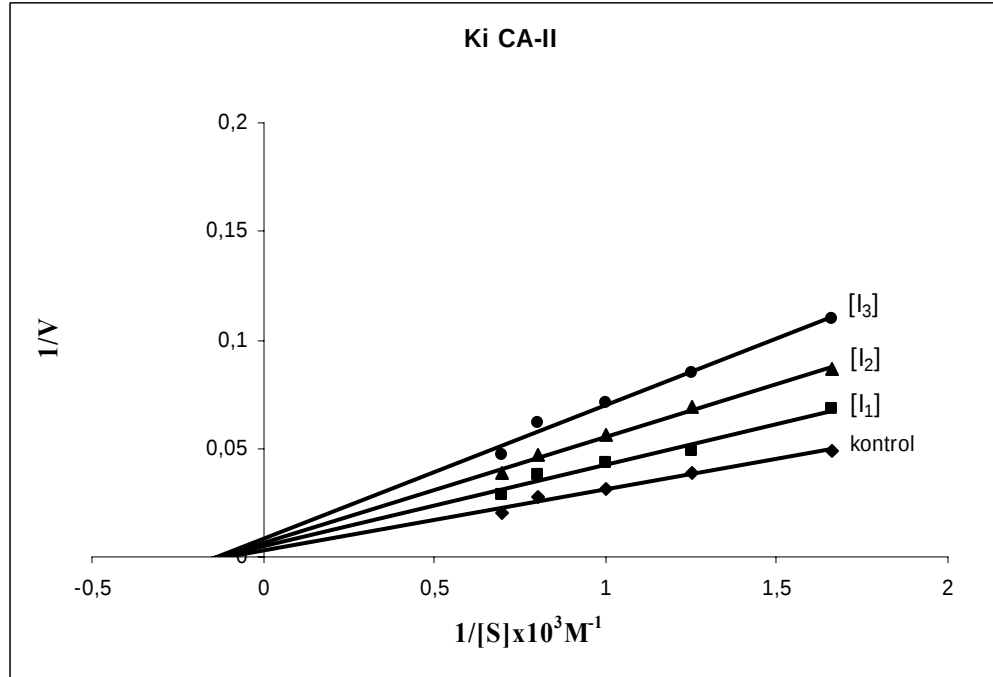
**Şekil 26.** İnsan Eritrosit CA I enzimi üzerinde Linoleik Asit bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği



**Şekil 27.** İnsan Eritrosit CA II enzimi üzerinde Linoleik Asit bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği



**Şekil 28.** İnsan Eritrosit CA I enzimi üzerinde Beta Karoten bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği



**Şekil 29.** İnsan Eritrosit CA II enzimi üzerinde Beta Karoten bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği

**Çizelge 7.** Bileşiklerin eritrosit CA I enziminin esteraz aktivitesi üzerinde yapılan in vitro inhibisyon çalışmaları toplu sonuçları

| İnhibitör     | [I] (μM)               | K <sub>i</sub> (μM)    | Ortalama K <sub>i</sub> (μM) | İnhibisyon Türü |
|---------------|------------------------|------------------------|------------------------------|-----------------|
|               | 3. 10 <sup>-6</sup>    | 6,18. 10 <sup>-6</sup> |                              |                 |
| Lektin        | 9. 10 <sup>-6</sup>    | 9,84 10 <sup>-6</sup>  | 8,25. 10 <sup>-6</sup>       | Yarışmasız      |
|               | 12. 10 <sup>-6</sup>   | 8,75 10 <sup>-6</sup>  |                              |                 |
|               | 1,28. 10 <sup>-7</sup> | 2,64. 10 <sup>-7</sup> |                              |                 |
| Linoleik Asit | 1,92. 10 <sup>-7</sup> | 2,11. 10 <sup>-7</sup> | 2,20. 10 <sup>-7</sup>       | Yarışmasız      |
|               | 2.56.10 <sup>-7</sup>  | 1,87. 10 <sup>-7</sup> |                              |                 |
|               | 0,26. 10 <sup>-6</sup> | 0,55. 10 <sup>-6</sup> |                              |                 |
| Beta Karoten  | 1.00. 10 <sup>-6</sup> | 1.10. 10 <sup>-6</sup> | 1,039. 10 <sup>-6</sup>      | Yarışmasız      |
|               | 2.01. 10 <sup>-6</sup> | 1,47. 10 <sup>-6</sup> |                              |                 |

**Çizelge 8.** Sentezlenen bileşiklerin eritrosit CA II enziminin esteraz aktivitesi üzerinde yapılan in vitro inhibisyon çalışmaları toplu sonuçları

| İnhibitör     | [I] (μM)                | K <sub>i</sub> (μM)    | Ortalama K <sub>i</sub> (μM) | İnhibisyon Türü |
|---------------|-------------------------|------------------------|------------------------------|-----------------|
|               | 1,38.10 <sup>-6</sup>   | 2,76. 10 <sup>-6</sup> |                              |                 |
| Lektin        | 2,77.10 <sup>-6</sup>   | 2,41.10 <sup>-6</sup>  | 2,49. 10 <sup>-6</sup>       | Yarışmasız      |
|               | 4,16. 10 <sup>-6</sup>  | 2,31.10 <sup>-6</sup>  |                              |                 |
|               | 0,59. 10 <sup>-6</sup>  | 1,18. 10 <sup>-6</sup> |                              |                 |
| Linoleik Asit | 1,78. 10 <sup>-6</sup>  | 1,55. 10 <sup>-6</sup> | 1,57. 10 <sup>-6</sup>       | Yarışmasız      |
|               | 3,56. 10 <sup>-6</sup>  | 3,56. 10 <sup>-6</sup> |                              |                 |
|               | 0,49. 10 <sup>-6</sup>  | 0,98. 10 <sup>-6</sup> |                              |                 |
| Beta Karoten  | 0,931. 10 <sup>-6</sup> | 0,80. 10 <sup>-6</sup> | 0,94. 10 <sup>-6</sup>       | Yarışmasız      |
|               | 1,86. 10 <sup>-6</sup>  | 1,03. 10 <sup>-6</sup> |                              |                 |

#### 4. SONUÇLAR 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 [44]. İlk defa memelilerin eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz (CA); canlılarda  $CO_2$ 'in hidrasyon ve  $HCO_3^-$ 'in dehidrasyonu reaksiyonlarını tersinir olarak katalizleyen bir enzimdir. Karbonik anhidrazın en güçlü organik inhibitörleri ise, aromatik ve heteroaromatik sülfonamidlerdir.

Bu çalışmada bazı hastalıkların ve göz hastalıklarının tedavisinde kullanılan mantarların en bilinenlerinden; *Ganoderma lucidum*(Reishi), *Lentinula edodes* (shiitake), Maitake (*Grifola frondosa*) mantarlarının etken maddesi olan beta D-glucan, lektin, linoleik asit, beta karotenin glokom tedavisinde kullanılmaya aday olarak karbonik anhidraz inhibitörlerinin insan karbonik anhidraz enzimi (CA I ve CA II) üzerinde inhibisyon etkileri incelenmiştir.

Çalışmalarda kullanılan karbonik anhidraz enzimi, afinite jeli hazırlanarak, eritrositlerden saflaştırılmıştır. Afinite kromatografisi ile karbonik anhidraz enzimlerinin saflaştırılması sırasında eluatların protein muhtevaları 280 nm de absorbansları ölçülerek belirlendi. Bu şekilde yapılan kalitatif tayin, proteinin yapısında bulunan tirozin ve triptofan amino asitlerinin söz konusu dalga boyunda maksimum absorbans vermesi esasına dayanır. Kantitatif protein tayinleri Coomassie-blue yöntemi ile belirlendi. Bu yöntemin diğer protein tayinlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin pek olmaması, protein-boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır. Enzim aktivitesi tayini için hidrataz ve esteraz aktiviteleri ölçüldü.

Bir inhibitörün inhibisyon etkisini belirlemede  $I_{50}$  değerleri kullanılmaktadır. CA I ve CA II enzimlerinin hidrataz aktiviteleri üzerinde beta D- glucan, lektin, linoleik asit ve beta karoten bileşiklerinin inhibisyon etkileri; glokom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan % 1'lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edilmek suretiyle araştırıldı. Bunun için insan kanından elde edilen CA I ve CA II enzimleri için beş farklı uygun inhibitör konsantrasyonunda hidrataz aktivite ölçümü yapıldı. İnhibisyon etkisi olan bileşiklerin %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek,  $I_{50}$  değerleri hesaplandı.

Beta D- glucan, lektin, linoleik asit ve beta karoten bileşiklerinin CA I ve CA II enzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi hidrataz aktivite ölçümleri yapılarak belirlendi. Bu

çalışmalar sonucunda çizilen % Aktivite-[I] M grafiklerinden bulunan  $I_{50}$  değerleri (çizelge 9) gösterilmiştir.

**Çizelge 9.** CA I ve CA II enzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi hidrataz aktivite ölçümleri sonucu % Aktivite-[I] M grafiklerinden bulunan  $I_{50}$  değerleri

| $I_{50}$ ( $\mu$ M) |               |               |
|---------------------|---------------|---------------|
| <b>İnhibitör</b>    | <b>CA I</b>   | <b>CA II</b>  |
| Beta D- Glucan      | Aktive ediyor | Aktive Ediyor |
| Lektin              | 2,41          | 2,52          |
| Linoleik Asit       | 2,3           | 1,48          |
| Beta Karoten        | -             | -             |

CA I ve CA II enzimlerinin esterase aktivitesi üzerinde Beta D- glucan, lektin, linoleik asit ve beta karoten bileşiklerinin inhibisyon etkileri; glokom hastalığı tedavisi için klinikte lokal olarak kullanılan miktar olan %1'lik çözeltileri hazırlanarak, enzim üzerine tatbik edildi. Daha sonra inhibisyon gösteren bileşikler için; insan kanından saflaştırılan eritrosit CA I ve CA II enzimleri için, beş farklı inhibitör konsantrasyonunda esterase aktivite ölçümü yapıldı. Her bir bileşik için %Aktivite-[I] grafikleri çizilerek,  $I_{50}$  değerleri hesaplandı.

Bileşiklerin CA I ve CA II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi in vitro esterase aktivite ölçümleri sonucu çizilen %Aktivite-[I] grafiklerinden elde edilen  $I_{50}$  değerleri (çizelge 10) özetlenmiştir.

**Çizelge 10.** CA I ve CA II enzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi esterase aktivite ölçümleri sonucu % Aktivite-[I] M grafiklerinden bulunan  $I_{50}$  değerleri

| $I_{50}$ ( $\mu$ M) |               |               |
|---------------------|---------------|---------------|
| <b>İnhibitör</b>    | <b>CA I</b>   | <b>CA II</b>  |
| Beta D- Glucan      | Aktive ediyor | Aktive Ediyor |
| Lektin              | 4,9           | 2,7           |
| Linoleik Asit       | 0,17          | 1,2           |
| Beta Karoten        | 1,45          | 0,92          |

Bunun sonucunda lektin ve linoleik asit bileşiklerinin HCA I ve HCA II hidrataz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisini veren  $I_{50}$  değerleri (sırasıyla 2,41 ,2,30 ve 2,52, 1,48  $\mu$ M) olarak bulunmuştur. İnsan CA-II enzimi üzerinde lektin ve linoleik asit bileşiklerinin iyi inhibisyon etkilerinin bulunması bu bileşiklerin glokom hastalığı tedavisinde kullanılabilecek aday inhibitörler olduğunu teyid etmektedir.

Bunun sonucunda lektin, linoleik asit ve beta karoten bileşiklerinin HCA I ve HCA II esteraaz aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisini gösteren  $I_{50}$  değerleri (sırasıyla 4,9, 0,17, 1,45 ve 2,7, 1,2, 0,92  $\mu$ M) olarak bulunmuştur. İnsan CA-II enzimi üzerinde lektin, linoleik asit ve beta karoten bileşiklerinin iyi inhibisyon etkisi göstermesi, bu bileşiklerin glokom hastalığı tedavisinde kullanılabilecek aday inhibitörler olduğunu teyid etmektedir.

Beta D- glucan, lektin, linoleik asit ve beta karoten bileşiklerinin çizelge 13 ve 14'daki sonuçlara göre HCA I üzerindeki inhibisyon etkisi incelendiğinde, lektin bileşiği için, ( $K_i= 8,25.10^{-6}$ ), linoleik asit bileşiği için, ( $K_i= 2,20. 10^{-7}$ ) ve beta karoten bileşiği için, ( $K_i=1,039.10^{-6}$ ) mM ve HCA II için. Lektin bileşiği için, ( $K_i= 2,49.10^{-6}$ ), Linoleik asit bileşiği için, ( $K_i= 1,57.10^{-6}$ ) ve beta karoten bileşiği için, ( $K_i=0,94. 10^{-6}$ ) mM Bu  $K_i$  sabitlerine sahip olmalarından dolayı iyi inhibitör özelliği gösteren bileşiklerdir. Bu sonuçlar  $I_{50}$  değerleri sonuçlarıyla örtüşmektedir.

Beta D- Glukan ise aktive etmektedir. CA aktivitesinin Alzheimer hastalığının tedavisinde ve antitümör olarak kullanılabilir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- [1] Bourquelot, E. ve Bertrand, A., 1895. A re-examination of the Raper's Scheme: Cyclodopa as a Biological precursor of eumelanin, C. R. Soc. Biol., 47,582-584.
- [2] Webster, J., 1989. Introduction to Fungi, Cambridge University Press, Melbourne, pp.:1-669
- [3] Alexopoulos, C. S. Mims, C.W., Blakwell, M., 1996. Introductory Mycology, John Wiley & Sons Inc., New York, pp.:1-441.
- [4] Kolcuoğlu, Y., 2005. Yabani ve Yenilebilir Bir Mantar Olan *Macrolepota mastoidea*'da Polifenol Oksidaz Enziminin Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- [5] Boztok, K., 1990. Mantar Üretimi Tekniği, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 489, 168, İzmir.
- [6] Manzi, P., Guzzi, A., Pizzaferrato, L., 2001. Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. Food Chemistry, 73, 321-325.
- [7] Smith, Rowan ve Sullivan 2002, Tıbbi Mantarlar ve Kanseri Tedavisi: Batı tıp, bir geleneksel uygulama çeviri Perspektifleri Biyoloji ve Tıp
- [8] Kabir, Y., Kimura, S., Tamura, T., 1988. Dietary effect of *Ganoderma lucidum* mushroom on blood pressure and lipid levels in spontaneously hypertensive rats (SHR). J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 34:433-438.
- [9] Tao, J., Feng, K.Y., 1990. Experimental and clinical studies on inhibitory effect of *Ganoderma lucidum* on platelet aggregation. J Tongji Med Univ, 10: 240- 243.
- [10] Kim, H.W. and Kim, B.K., 2002. Recent advances on the biologically active triterpenoids of *Ganoderma lucidum*, in *Ganoderma: Genetics, Chemistry, Pharmacology and Therapeutics*, LIN, Z.B., Ed., Beijing Medical University Press, Beijing, 10-19.
- [11] Chihata, L., Okumura, K., Tabayama, S., Kotera, K. 1969. Lentinacin: a new hypocholesterolemic substance in *Lentinus edodes*. Specialist Experientia, 25, 1237-1238.
- [12] Ooi, V. E. C., Liu, F. 2000. Immunomodulation and anticancer activity of polysaccharide-protein complexes. Curr. Medicinal Chemistry, 7, 715-729
- [13] Chang, R., 1996. Functional properties of edible mushrooms. Nutrition Reviews, 54, 591-593.
- [14] Chihara, G., Maeda, Y., Hamura, J., Sasaki, T., Fukuoka, F., 1969. Inhibition of mouse Sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes*, Nature 222, 687-688
- [15] Smania, A. J., Monache, F. D., Smania, E.F., Gıl, M.L., Benchetrit, L.C., CRUZ, F.S., 1995. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus*. Murr. Journal of Ethnopharmacology, İngiltere, 45, 177- 181.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [16] Tochikura, T., Nakashima, H., Ohashi, Y., Yamamoto., 1988. Inhibition (in vitro) of replication and of the cytopathic effect of human immunodeficiency virus by an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Medicinal Microbiology Immunoludition*, 177, 235-44.
- [17] Freunhauf, J. P., Bonnard, G. D., Heberman, R. B., 1982. The effect of lentinan on production on interleukin-1 by human monocytes. *Immunopharmacology*, 5, 65-74
- [18] Chihara, G., Maeda, Y. Y., Suga, T., Hamuro, J., (1989). Lentinan as a Host Defense Potentiator. *International Journal of Immunotherapy*, 4, 145-154.
- [19] Jong, S. C., Birmingham, J. M., 1992. Medicinal benefits of Shiitake mushrooms. *Advanced Application Microbial*, 37, 101-134
- [20] Goldstein, I.J., Hughes, R.C., Monsigny, M., Osawa, T., Sharon, N. (1980). What should be called a lectin? *Nature*, 285, 66.
- [21] Dixon, H.B.F. (1981). Defining a lectin. *Nature*, 292, 192p.
- [22] Sharon, N. ve Lis, H. (1990). Legume lectins -a large family of homologous proteins. *The FASEB Journal*, 4, 3198-3208.
- [23] Goldstein, I.J. ve Hayes, C.E. (1978). The Lectins: Carbohydrate-binding proteins of plants and animals, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 35,127-340.
- [24] Akev, N. (1989). Lektinler. *Biyokimya dergisi*, 14, 51-61.
- [25] Seyrek, K. ve Bildik, A. (2001). Lektinler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dergisi*, 12, 96-100.
- [26] Sharon, N. ve Lis, H. (1990). Legume lectins -a large family of homologous proteins. *The FASEB Journal*, 4, 3198-3208.
- [27] Lis, H. ve Sharon, N. (1986). Biological properties of lectins. \_çinde I.E. Liener, N. Sharon ve I.J. Goldotein (Ed.). *The Lectins*. Academic Press, 265-291
- [28] Gül, N., Cebesoy, S. ve Ozsoy, N. (2008). Lectins binding during alloxan-induced diabetes soleus muscle. *African Journal of Biotechnology*, 7, 926-930.
- [29] Anadolu, R.Y., Erdem, C., Erdi, H., Taspınar, A. (1992). Skuamöz hücreli karsinoma tanısında peanut agglutinin. *Dermatoloji Dergisi*, 1,46-50.
- [30] Beuth, J., Ko, H.L., Schirmacher, V., Uhlenbruck, G., Pulverer, G. (1988). Inhibition of liver tumor cell colonization in two animal tumor models by lectin blocking with D-galactose or arabinogalactan. *Clinical and Experimental Metastasis*, 6, 115-120.
- [31] De Mejía, E.G. ve Prisecaru, V.I. (2005). Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 425-445.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [32] Nas S., Gökalp Y.H., Ünsal M., 2001. Bitkisel yağ teknolojisi. Pamukkale Üniversitesi Mimarlık Fakültesi Matbaası, 322.
- [33] Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. Carcinogenesis 1987; 8: 1881-7.
- [34] Can A., Özçelik B., Güneş G., 2005. Meyve Sebzelerin Antioksidan Kapasiteleri. GAP IV. Tarım Kongresi Bildirileri
- [35] Niki E., Shimaski H., Mino M., 1994. Antioxidantism-free radical and biological defense. Gakkai Syuppan Center.
- [36] Mau J.L., Lin H.C., S.F. Song., 2002. Antioxidant properties of specialty mushrooms. Food Chemistry, 35 : 519-526. Mau J.L., Lin H.C., Song S.F., 2002. Antioxidant properties of several specialty mushrooms. Food Research Intern., 35: 519-526.,
- [37] Türkoğlu A., Duru M.E., Mercan N., Kıvrak G., Gezer K., 2006 b. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. Food Chemistry, 101 (1): 267 273.
- [38] Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M., 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90: 7915-7922.
- [39] British Cancer Organization Calls for Warning Labels on Beta-Carotene (İngilizce) (2000-07 31). 2007-03-15
- [40] The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group (1994) The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. N Engl J Med 1994;330:1029-1035
- [41] Omenn et al. (1996) Risk Factors for Lung Cancer and for Intervention Effects in Carot, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial Journal of the National Cancer Institute 1996 88(21):1550-1559
- [42] Bjelakovic et al., Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: Systematic review and meta-analysis, JAMA, 297:842; Feb. 28, 2007 <http://jama.ama-assn.org/cgi/content/abstract/297/8/842>
- [43] Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, Ö. İ., 2004, Biyokimya, Aktif Yayınevi, 642 s
- [44] Champe, P.C. ve Harvey, R.A., 1997, Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri, 438 s.
- [45] İnan, Y. ve Gül, M., 2001, Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., 447 s.
- [46] Harper, H. 1975. Enzymes. Review of physiological chemistry. Californiyalos Altos 15<sup>th</sup> Edition. 126-172p.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [47] Maren, T. H., 1967, Carbonic Anhydrase; chemistry, physiology and inhibition. *Physiol. Rev.*, 47, 595 p.
- [48] Carter, M. J., 1972, carbonic anhydrase; isoenzymes, properties, distribution, and functional significance. *Biol. Rev.* 42, 465.
- [49] Pocker, Y. and Janjic, N., 1989, Molecularity of Water in Enzymic Catalysis. Application to Carbonic anhydrase II, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 731 p.
- [50] 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.*, 241, 5137 p
- [51] 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.
- [52] Rickli, E. E., Ghazanfar, S. A. S., Gibbons, B. H. and Edsall, J. T., 1964, Carbonic anhydrase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 239, 1065.
- [53] Nyman, P. O. and Lindskog, S., 1964, Amino acid compositions of the various forms of bovine and human erythrocyte carbonic anhydrase. *Biochem. Biophys. Acta.*, 85, 1411.
- [54] Pocker, Y. and Sarkanen, S., 1979, Carbonic anhydrase; Structure, catalytic versatility and inhibition. *Advances in Enzymology*, 49, 149.
- [55] Kaiser, E. T. and Lo, K. W., 1969, The carbonic anhydrase catalysed hydrolysis of 2-hydroxy-5-nitrotoluene sulfonic sulfone. *J. Am. Chem. Soc.*, 91, 4912
- [56] Wistrand, P. J., 1980, Solubilization and preliminary characterization of membrane-bound carbonic anhydrase. *Uppsala J. Med. Sci.*, 85, 75.
- [57] Björkbacka, H., Johansson, I. M., Skarfstad, E. and Forman, C., 1997, The sulfhydryl groups of Cys269 and Cys272 are critical for oligomeric state of chloroplast carbonic anhydrase from *Pisum sativum*. *Biochem.*, in press
- [58] Stams, T., Chen, Y., Boriack – Sjödin, P. A., Hurt, J. D., Liao, J., May, J. A., Dean, T., Laipis, P. and Christianson, D. W., 1998, *Protein Sci.*, 7, 556 p
- [59] Briganti, F., Pierattelli, A., Scozzafava, A. and Supuran, C. T., 1996 *Eur. J. Med. Chem.*, 31, 1001 p.
- [60] Maren, T. H. and Conroy, C. W., 1993, A new class of carbonic anhydrase inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 268, 26233-26239 p
- [61] 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.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [62] Hakansson, K., Carlsson, M., Svensson, L. A. and Liljas, A. 1992, Structure of native and apo carbonic anhydrase II. *J. Mol. Biol.* 227 : 1192-1204 p.
- [63] Roughton, F. J. W. and Booth, V. H. 1946, The Effect of substrate concentration, pH and other factors upon the activity of carbonic anhydrase. *Biochem. J.* (40) : 319 p.
- [64] Tozlu, İ., 1997, Eritrositlerinden Afinite Kromatografisi ile saflaştırılan Karbonik Anhidraz Enziminin Kinetik Ve Elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi (Yüksek Lisans Tezi). Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilimdalı, Van
- [65] Lindskog, S. and Wistrand, P. J. 1988, Inhibitors of carbonic anhydrase. In: *Design of Enzyme Inhibitors as Drugs*, pp. 698-723 p.
- [66] Maren, T. H. and Janskowska, L., 1985, Ocular pharmacology of sulfonamides: The cornea as barrier and depot. *Cur. Eye. Res.*, 4, 399 p.
- [67] Sugrue, M. F., 1996, The preclinical pharmacology of dorzolamide hydrochloride, a topical carbonic anhydrase inhibitor. *J. Ocular Pharmacol. Ther.*, 12, 363-376 p.
- [68] Webster, J., 1989. *Introduction to Fungi*, Cambridge University Press, Melbourne, pp.:1-669
- [69] Alexopoulos, C. S. Mims, C.W., Blakwell, M., 1996. *Introductory Mycology*, John Wiley & Sons Inc., New York, pp.:1-441.
- [70] 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.
- [71] Kandel, M., Gonall, A. G., Wong, S. and Kondel, S. I., 1970, Some characteristics of human, bovine and horse carbonic anhydrase as revealed by inactivation studies. *J. Biol. Chem.*, 245, 2444 p.
- [72] Landolfi, C., Marchetti, M., Ciocchi, G. and Milanese, C., 1998, Development and pharmacological characterization of carbonic anhydrase activity. *J. Pharm. And Toxicol. Meth.*, 38, 169 – 172 p.
- [73] Kohn, J. and Wilchek, M. A., 1978, Colormetric method for monitoring activation of sepharose by cyanogen bromide. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 7, 14 p.
- [74] Chiou, C. Y., 1981, *Biochem. Pharm.*, 30, 103 p.