

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

**BAZI BİYOAKTİF PEPTİDLERİN İNSAN SERUMUNDAN SAFLAŞTIRILAN
ANJİOTENSİN KONVERTİNG ENZİM (ACE, E.C.3.4.15.1)
AKTİVİTESİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Resul ADANAŞ
Danışman: Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU

VAN – 2023

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

**BAZI BİYOAKTİF PEPTİDLERİN İNSAN SERUMUNDAN SAFLAŞTIRILAN
ANJİOTENSİN KONVERTİNG ENZİM (ACE, E.C.3.4.15.1)
AKTİVİTESİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Resul ADANAŞ

VAN – 2023

KABUL VE ONAY SAYFASI

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU danışmanlığında, Resul ADANAŞ tarafından sunulan “Bazı Biyoaktif Peptidlerin İnsan Serumundan Saflaştırılan Anjiotensin Konverting Enzim (ACE, E.C.3.4.15.1) Aktivitesine Etkisinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 25/12/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU

İmza:

Üye: Prof. Dr. Fatih Çağlar ÇELİKEZEN

İmza:

Üye: Doç. Dr. Necati ÖZOK

İmza:

Üye: Doç. Dr. Mahire BAYRAMOĞLU AKKOYUN

İmza:

Üye: Doç. Dr. Zehra BAŞ

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

İmza

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

İmza

Resul ADANAŞ



ÖZET

BAZI BİYOAKTİF PEPTİDLERİN İNSAN SERUMUNDAN SAFLAŞTIRILAN ANJİOTENSİN KONVERTİNG ENZİM (ACE, E.C.3.4.15.1) AKTİVİTESİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ADANAŞ, Resul

Doktora Tezi, Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Vedat Türkoğlu

Aralık 2023, 59 sayfa

Biyoaktif peptidler, hipertansiyon tedavisinde kullanılan sentetik anjiotensin konverting enzim (ACE) inhibitörlerine doğal ve önemli bir alternatiftir. Bu çalışmada ACE, afinite kromatografisi işlemi ile insan serumundan tek adımda 3575 kat saflaştırıldı. ACE enziminin molekül ağırlığı SDS-PAGE yöntemi ile 60 kDa ve 70 kDa olmak üzere iki alt birim olarak belirlendi. Lineweaver-Burk grafiğinden V_{max} ve K_M değerleri sırasıyla $96.15 (\mu\text{mol/dk}).\text{mL}^{-1}$ ve 0.2 mM olarak hesaplandı. Gly-Pro (GP), Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) ve Ser-Asp-Gly-Arg-Gly (SDGRG) biyoaktif peptidlerinin saflaştırılan ACE aktivitesi üzerine etkisi araştırıldı. Ayrıca spesifik bir ACE inhibitörü olan lisinopril bileşiğinin inhibisyon etkisi belirlendi. İnsan serumundan saflaştırılan ACE aktivitesi üzerine GP, RGDS ve SDGRG önemli ölçüde inhibitör etkisi gösterdi. Bu peptidler için IC_{50} değerleri sırasıyla $184.71 \mu\text{M}$, $107.16 \mu\text{M}$ ve $32.54 \mu\text{M}$ olarak bulundu. Lineweaver-Burk grafikleri ile GP, RGDS ve SDGRG için K_i değerleri ve inhibitör türü bulundu. Bu peptidler için inhibitör türü, dönüşümlü-yarışmalı inhibitör olarak belirlendi. K_i değerleri GP, RGDS ve SDGRG için sırasıyla $260.02 \mu\text{M}$, $63.44 \mu\text{M}$ ve $11.42 \mu\text{M}$ olarak hesaplandı. Lisinoprilin IC_{50} değeri 0.35 nM olarak bulundu. Lisinoprilin inhibisyon tipi, dönüşümlü-yarışmasız inhibitör ve K_i değeri 0.15 nM olarak belirlendi. Bu çalışmada GP, RGDS ve SDGRG peptidlerinin ACE aktivitesi üzerine inhibitör etkisi göstermesi ile bu peptidlerin hipertansiyon tedavisinde alternatif olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Anjiotensin konverting enzim, Biyoaktif peptidler, İnhibisyon, Saflaştırma



ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF SOME BIOACTIVE PEPTIDES ON THE ACTIVITY OF ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME (ACE, E.C.3.4.15.1) PURIFIED FROM HUMAN SERUM

ADANAŞ, Resul

Ph.D. Thesis, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU

December 2023, 59 pages

Bioactive peptides are a natural and important alternative to synthetic angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors used in the treatment of hypertension. In this study, ACE was purified 3575-fold from human serum in a single step by affinity chromatography process. The molecular weight of the ACE enzyme by SDS-PAGE method was determined as two subunits, 60 kDa and 70 kDa. V_{max} and K_M values with the Lineweaver-Burk graph were determined as $96.15 (\mu\text{mol/min}).\text{mL}^{-1}$ and 0.2 mM, respectively. The effect of Gly-Pro (GP), Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS), and Ser-Asp-Gly-Arg-Gly (SDGRG) bioactive peptides on purified ACE activity was investigated. In addition, the inhibition effect of lisinopril, a specific ACE inhibitor, was determined. GP, RGDS, and SDGRG showed a significant inhibitory effect on ACE activity purified from human serum. IC_{50} values for these peptides were found to be 184.71 μM , 107.16 μM , and 32.54 μM , respectively. K_i values and inhibitor type for GP, RGDS and SDGRG were found with Lineweaver-Burk graphs. The inhibitor type for these peptides was designated as a reversible-competitive inhibitor. K_i values were calculated as 260.02 μM , 63.44 μM , and 11.42 μM for GP, RGDS, and SDGRG, respectively. The IC_{50} value of lisinopril was determined as 0.35 nM. The type of inhibition of lisinopril was determined as a reversible-non-competitive inhibitor and the K_i value was 0.15 nM. In this study, it was concluded that GP, RGDS and SDGRG peptides may be an alternative in the treatment of hypertension as they have inhibitory effects on ACE activity.

Keywords: Angiotensin converting enzyme, Bioactive peptides, Inhibition, Purification



TEŞEKKÜR

Bu doktora tez çalışması, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU yönetiminde Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma laboratuvarında yapılmıştır. Doktora tez çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren saygı değer hocam Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tezimin her aşamasında yardımını esirgemeyen Doç. Dr. Zehra BAŞ'a çok teşekkür ederim.

2023

Resul ADANAŞ



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Renin Anjiotensin Sistemi	1
1.2. Anjiotensin Konverting (Dönüştürücü) Enzim	4
1.3. Anjiotensin Konverting (Dönüştürücü) Enzim İnhibitörleri	6
1.4. Hipertansiyon (Yüksek Kan Basıncı)	7
1.5. Biyoaktif Peptidler	8
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM	17
3.1. Materyal	17
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	17
3.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	17
3.1.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	18
3.1.3.1. Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler	18
3.1.3.2. Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler	18
3.1.3.3. Kolon Dolgu Maddesi için Kullanılan Çözeltiler	19
3.1.3.4. Afinite Kromatografisi Kolonunda Kullanılan Çözeltiler	19
3.1.3.5. SDS-PAGE Elektroforez için Kullanılan Çözeltiler	20
3.2. Yöntem	21
3.2.1. Protein Tayini	21
3.2.1.1. Kalitatif Protein Tayini	21
3.2.1.2. Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini	21
3.2.2. Afinite Kolonunun Hazırlanması	22

3.2.3. İnsan Serumu Anjiotensin Konverting Enziminin Saflaştırılması.....	23
3.2.3.1. İnsan Serumu Eldesi	23
3.2.3.2. İnsan Serumunun Afinite Kolonuna Uygulanması ve Enzim Elüsyonu	24
3.2.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE) ile ACE'nin Saflığının Kontrolü.....	24
3.2.5. İnsan Serumu ACE'nin Alt Birimlerinin SDS-PAGE ile Molekül Ağırlıklarının Belirlenmesi.....	26
3.2.6. İnsan Serumu ACE İçin V_{max} ve K_M Değerlerinin Belirlenmesi	26
3.2.7. ACE ile Yapılan Kinetik Çalışmalar	27
3.2.7.1. İnsan Serumu ACE Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	27
3.2.7.2. İnsan Serumu ACE Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi	27
3.2.8. ACE Enzim Aktivitesinin Ölçümü	27
3.2.9. GP, RGDS, SDGRG ve Lisinopril Bileşiklerinin Çözeltilerinin Hazırlanması.....	29
3.2.10. ACE ile Yapılan Kinetik Çalışmalar	29
3.2.10.1 İnsan Serumu ACE Aktivitesi Üzerine GP, RGDS, SDGRG ve Lisinopril Bileşiklerinin Etkilerinin Belirlenmesi.....	29
3.2.11. İnsan Serumu ACE Aktivitesi Üzerine Etkisi İncelenen GP, RGDS, SDGRG ve Lisinopril Bileşiklerinin K_i Değeri, İnhibisyon Türü ve IC_{50} Değerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar.....	30
4. BULGULAR	31
4.1. Kantitatif Protein Tayini için Hazırlanan Standart Grafik.....	31
4.2. İnsan Serumu ACE Enziminin Afinite Kromatografisi Yöntemi ile Saflaştırılması Sonuçları	31
4.2.1. İnsan Serumu ACE Enzimi için Saflaştırma Sonuçları	31
4.3. İnsan Serumu ACE Enziminin SDS-PAGE Yöntemi ile Saflığının Kontrolü....	33
4.4. İnsan Serumundaki Anjiotensin Konverting Enzimin Alt Birimlerinin SDS- PAGE Yöntemi ile Molekül Ağırlığının Bulunmasına Ait Sonuçlar	34
4.5. İnsan Serumu ACE için V_{max} ve K_M Değerlerinin Belirlenmesi Sonuçları.....	35
4.6. İnsan Serumu ACE Enzimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi Sonuçları	35
4.7. İnsan serumu ACE Enzimi Üzerine pH'nın Etkisi Sonuçları.....	36

4.8. İnsan Serumu ACE Enzimi Üzerine GP, RGDS, SDGRG ve Lisinopril Bileşiklerinin Etkilerinin Belirlenmesine Ait Çalışma Sonuçları.....	37
4.9. İnsan serumu ACE Enzimi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren GP, RGDS, SDGRG ve Lisinopril Bileşiklerinin İnhibisyon Tipinin Bulunmasına Ait Çalışma Sonuçları	42
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	45
KAYNAKLAR.....	51
ÖZ GEÇMİŞ.....	59



ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 3.1 SDS-PAGE elektroforezi için ayırma jeli ve yığma jeli	
konsantrasyonları	26
Çizelge 3.2 İnsan serumu ACE enziminin GP, RGDS, SDGRG ve Lisinopril içeren	
aktivite ölçüm kuvvet içeriği	30
Çizelge 4.1 İnsan serumu ACE enziminin saflaştırma adımları.....	33
Çizelge 4.2 İnsan serumu ACE enziminin sıcaklık, aktivite ve % aktivite değerleri.....	36
Çizelge 4.3 İnsan serumu ACE enziminin pH, aktivite ve % aktivite değerleri	37
Çizelge 4.4 İnsan serumundaki ACE enziminin GP konsantrasyonu ile değişen aktivite	
ve % aktivite değerleri	38
Çizelge 4.5 İnsan serumundaki ACE enziminin RGDS konsantrasyonu ile değişen	
aktivite ve % aktivite değerleri	39
Çizelge 4.6 İnsan serumundaki ACE enziminin SDGRG konsantrasyonu ile değişen	
aktivite ve % aktivite değerleri	40
Çizelge 4.7 İnsan serumundaki ACE enziminin lisinopril konsantrasyonu ile değişen	
aktivite ve % aktivite değerleri	41
Çizelge 4.8 İnsan serumundaki ACE için bulunan IC_{50} ve K_i değerleri ve inhibisyon tipi	
.....	41



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1 Renin anjiotesin sistemi (RAS)	3
Şekil 3.1 FAPGG bileşiğinin FAP ve GG bileşiklerine hidrolizi.....	28
Şekil 4.1 Bradford metodu ile proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik.....	31
Şekil 4.2 Afinite kolonundan elde edilen insan serumu tüplerinin kalitatif protein tayinleri ve aktivite değerleri.....	33
Şekil 4.3 İnsan serumundan saflaştırılan anjiotensin konverting enzimin SDS-PAGE fotoğrafı ve standart markırın orjinal göstergesi	34
Şekil 4.4 İnsan serumu ACE enziminin SDS-PAGE ile alt birimlerinin molekül ağırlığının bulunmasında kullanılan standart grafik.....	35
Şekil 4.5 İnsan serumu ACE enziminin sıcaklık-% aktivite grafiği.....	36
Şekil 4.6 İnsan serumu ACE enziminin pH - % aktivite grafiği	37
Şekil 4.7 İnsan serumundaki ACE enzimi üzerine GP peptidinin etkisi	38
Şekil 4.8 İnsan serumundaki ACE enzimi üzerine RGDS peptidinin etkisi	39
Şekil 4.9 İnsan serumundaki ACE enzimi üzerine SDGRG peptidinin etkisi	40
Şekil 4.10 İnsan serumundaki ACE enzimi üzerine lisinopril bileşiğinin etkisi.....	41
Şekil 4.11 İnsan serumu ACE enzimi üzerine GP peptidinin Lineweaver-Burk grafiği	42
Şekil 4.12 İnsan serumu ACE enzimi üzerine RGDS peptidinin Lineweaver-Burk grafiği	43
Şekil 4.13 İnsan serumu ACE enzimi üzerine SDGRG peptidinin Lineweaver-Burk grafiği	43
Şekil 4.14 İnsan serumu ACE enzimi üzerine lisinopril bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği	44



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
$\mu\text{g/mL}$	Mikrogram/mililitre
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
cm Hg	Santimetre civa
mm Hg	Milimetre civa
Da	Dalton
dk	Dakika
EU	Enzim ünitesi
g	Gram
IC_{50}	%50 inhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyonu
kcal	Kilokalori
K_{kat}	Turnover sayısı
kDa	Kilodalton
K_i	İnhibisyon sabiti
K_M	Michealis Menten sabiti
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
mg/mL	Miligram/mililitre
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
nM	Nanomolar

Simgeler**nm****°C****V_{max}****Açıklama**

Nanometre

Santigrat derece

Maksimum hız

Kısaltmalar**Açıklama****ACE**

Anjiotensin Konverting Enzim

ACE2

Anjiotensin Konverting Enzim 2

AGT

Anjiotensinojen

AHA/ACCAmerikan Kalp Derneği/Amerikan
Kardiyoloji Koleji**APS**

Amonyum Persülfat

AT₁R

Anjiotensin II Tip 1 Reseptörü

AT₂R

Anjiotensin II Tip 2 Reseptörü

BP

Biyoaktif Peptidler

CoCl₂

Kobalt Klorür

CYP11B2

Aldosteron Sentaz

DKB

Diyastolik Kan Basıncı

DSÖ

Dünya Sağlık Örgütü

EDTA

Etilen Diamin Tetra Asetik Asit

eNOS

Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz

ESC

Avrupa Kardiyoloji Derneği

FAPGGN-[3-(2-Furil)akriloil]-Fenil-Glisil-
Glisin**GP**

Gly-Pro

GSH

Redükte Glutayon

GSSG

Okside Glutayon

HCl

Hidroklorik Asit

Kısaltmalar

Açıklama

HEPESNa

(2-[4-(2-Hidroksietil) Piperazin-1-İl]
Etan Sülfonik Asit Sodyum)

HHL

Hippuril-histidil-lösin

JNC8

Sekizinci Ortak Ulusal Komisyon

LDDHFL

Leu-Asp-Asp-His-Phe-Leu

LGVP

Leu-Gly-Val-Pro

LTQKVVFF

Leu-Thr-Glu-Lys-Val-Val-Phe

Na₂B₄O₇.10H₂O

Sodyum Tetra Borat

NaCl

Sodyum Klorür

NaHCO₃

Sodyum Bikarbonat

NaN₃

Sodyum Azid

Nano-LC-ESI-MS/MS

Nano Sıvı Kromatografisi-
Elektrosprey İyonizasyon-Tandem
Kütlesi

nativ-PAGE

Nativ-Poliakrilamid Jel Elektrofözezi

NHS

N-Hidroksisüksinimid

PCT

Proksimal Kıvrımlı Tübül

RAS

Renin Anjiotensin Sistemi

R_f

Göreceli Göç

RGDS

Arg-Gly-Asp-Ser

RP-HPLC

Ters Fazlı-Yüksek Performanslı Sıvı
Kromatografisi

SDGRG

Ser-Asp-Gly-Arg-Gly
Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid

SDS-PAGE

Jel Elektrofözezi

SHR

Spontan Hipertansif Ratlar

SKB

Sistolik Kan Basıncı

TEMED

N,N,N',N'-Tetrametil Etilendiamin

Tris

Trihidroksimetil Aminometan

VPGEPPK

Pro-Gly-Pro-Glu-Pro-Lys-Pro

Kısaltmalar**Açıklama****VTY**

Val–Thr–Tyr

ZnCl₂

Çinko Klorür



1. GİRİŞ

Hipertansiyon, mortalite için önde gelen risk faktörü olarak tanımlanmıştır. Son yıllarda, ilaç tedavisi, yüksek tansiyon ile ilişkili çeşitli komplikasyonların eğilimini azaltmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak birçok antihipertansif ajanın yan etkileri gözlemlenmiştir. Çok sayıda koruyucu ve terapötik ilaç tedavisine ek olarak, kardiyovasküler sağlığa katkıda bulunabilecek diyet bileşiklerinin tanımlanmasında önemli ilerlemeler sağlanmıştır. Bu bileşikler arasında antihipertansif özelliklere sahip peptidler, önemli etkinlikleri, düşük toksisiteleri ve hızlı bağırsak emilimleri nedeniyle son zamanlarda özel ilgi görmüştür (Chockalingam vd., 2006; Xiang vd., 2023).

En önemli antihipertansif hedeflerden biri, kan basıncının düzenlenmesinde merkezi rol oynayan monomerik, çinko ve klorür bağımlı bir peptidil dipeptidaz olan anjiotensin dönüştürücü enzimdir (ACE). Pek çok oligopeptidin, ACE enzimini yarışmalı bir şekilde inhibe ederek belirgin antihipertansif etki gösterdiği bulunmuştur. Klinik araştırmalar ayrıca, ACE inhibe edici peptidlerin, özellikle bir diüretik ile kombine edildiğinde, sadece kan basıncını düşürmede etkili olmadığını, aynı zamanda anjinayı iyileştirdiğini ve enfarktüs sonrası mortaliteyi azalttığını da ortaya çıkarmıştır. Doğal kaynaklardan elde edilen peptidler güvenlidir ve sağlık risklerini azaltır. Bu yüzden ACE inhibitörü özelliklerine sahip doğal peptidler sentetik ACE inhibitörlerine güvenli bir alternatif olarak kullanılabilir (Martínez-Maqueda vd., 2012; Arendse vd., 2019; Garzón vd., 2022). Bu çalışmamızda, ACE insan serumundan afinite kromatografisi metodu ile tek adımda saflaştırıldı ve karakterize edildi. Saf ACE aktivitesi üzerine Gly-Pro (GP), Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) ve Ser-Asp-Gly-Arg-Gly (SDGRG) biyoaktif peptidlerinin inhibisyon etkisi araştırıldı.

1.1 Renin Anjiotensin Sistemi

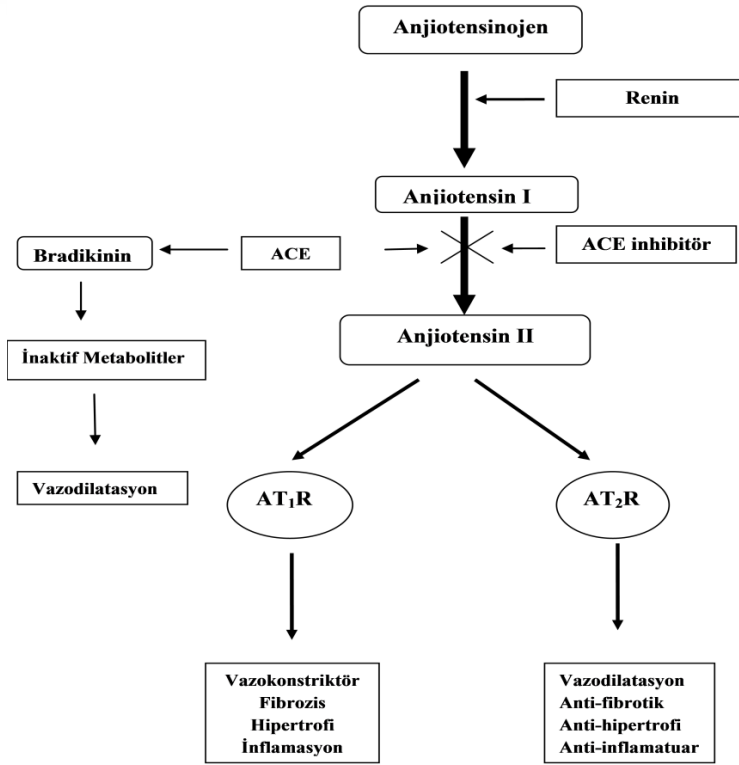
Böbrekler, sodyum dengesini ve hücre dışı sıvı hacmini düzenleyerek arteriyel basıncın uzun süreli kontrolünde temel bir rol oynar. Renin-anjiotensin sistemi (RAS), hipertansiyon ve ilerleyici böbrek hasarının düzenlenmesinin merkezinde yer alır. Sadece sistemik RAS'ın değil, aynı zamanda intrarenal RAS'ın da hipertansiyon ve böbrek hasarının patogeneğinde ve ilerlemesinde spesifik etkileri olduğu belirlenmiştir.

RAS bileşenlerinin tümü böbrekte bulunur ve intrarenal anjiotensin II çoklu mekanizmalarla oluşturulur. Spesifik renal kompartımanlarda çok yüksek anjiotensin II seviyelerinin gösterilmesi böbrekte anjiotensin II'nin seçici lokal regülasyonuna işaret ederek intrarenal anjiotensin II seviyelerinin dolaşımdaki anjiotensin II'den farklı bir şekilde düzenlendiğini gösterir. RAS'ın uygun nefrogenezi içermedeki önemi de iyi bilinmektedir ve fetal gelişim sırasında RAS'ın baskılanması, hipertansiyonun fetal programlama modellerinde gözlenen yapısal ve fizyolojik değişikliklere aracılık etmede anahtar bir rol oynayabilir (Yim ve Yoo, 2008).

Kan basıncı ve hacim homeostazının düzenlenmesinde ve hipertansiyonun patofizyolojisinde renin-anjiotensin sisteminin (RAS) sistemik rolü bulunmaktadır. Anjiotensin II aldosteron ve kan basıncını yükselttiği ve kardiyak, vasküler ve renal dokular üzerindeki doğrudan etkileri yoluyla son organ hasarının gelişimine katkıda bulunduğu için artan RAS aktivitesi aynı zamanda çok sayıda patolojik durum için önemli bir belirleyicidir (Toke ve Meyer, 2001; Paul vd., 2006; Yim ve Yoo, 2008).

İyi bilindiği gibi, anjiotensin II sistemik olarak üretilir. RAS'ın substratı olan anjiotensinojen (AGT) karaciğerden salınır ve böbrekteki jukstaglomerüler aparatın salgıladığı renin tarafından dolaşımda bölünerek anjiotensin I oluşturur. Anjiotensin II, ağırlıklı olarak pulmoner dolaşımdaki endotel hücrelerinin yüzeyinde yüksek seviyelerde eksprese edilen anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) tarafından sağlanır (Ichihara vd., 2004). RAS'ın en güçlü aktif ürünü olarak kabul edilen anjiotensin II, spesifik reseptörler üzerinde etkilidir. Özellikle, RAS'ın bu durumu, sistemin karmaşıklığını artıran daha yeni bulgularla genişletilmiştir. Farklı anjiotensin reseptörleri ve sinyal iletim yolları tarif edilmiştir. Ayrıca, anjiotensin 1-7 gibi başka peptidler de tanınmıştır ve örneğin; serin proteaz kimaz tarafından anjiotensin II oluşumunun alternatif yolları önerilmiştir. Sonuç olarak RAS incelemesinde meydana gelen değişiklik, "lokal" veya "doku" RAS kavramını ortaya çıkarmıştır. Bunlar arasında, intrarenal RAS'ın patofizyolojik etkileri, hipertansiyon ve ilerleyici böbrek hasarının patogenezinde ana ilgi odağı olmuştur. Hipertansiyon ve böbrek hasarının gelişimi ve ilerlemesi üzerinde çeşitli patolojik etkiler sergileyen intrarenal RAS'ın kardinal rolünü desteklemek için artık çok sayıda veri mevcuttur (Paul vd., 2006; Yim ve Yoo, 2008).

Hücre büyümesi ve apoptoz gibi hücresel düzeyde yaygın anjiotensin II eylemleri, önemli fizyolojik uyaranların ana faktörleri olabilir. RAS genlerinin transgenik aşırı ekspresyonu ve knock-out (gen silinmesi) hayvan modelleri, RAS'ın doğum öncesi gelişimde işlevsel bir rolü olduğunu göstermiştir. Ek olarak, çok sayıda epidemiyolojik ve deneysel çalışma, RAS'ın hipertansiyon ve yetişkin hastalığının fetal programlanmasında derin bir rol oynadığını göstermiştir. Fetal yaşam sırasında programlama, olumsuz bir fetal ortamla uyumlu olarak gerçekleşir ve yapısal ve fizyolojik değişikliklere ve ardından hipertansiyon gelişimine yol açan uzun vadeli adaptif tepkilere yol açar (Barker vd., 1989; Petrie vd., 2001; Brand vd., 2006; Yim ve Yoo, 2008).



Şekil 1.1 Renin anjiotensin sistemi (RAS)

1.2 Anjiotensin Konverting (Dönüştürücü) Enzim

Hipertansiyon, dünya çapında birçok insanı etkileyen önemli bir sağlık sorunudur ve kardiyovasküler hastalıklar için ciddi bir risk faktörüdür. Anjiotensin konverting (dönüştürücü) enzim (ACE, EC 3.4.15.1), kan basıncının düzenlenmesinde yer alan önemli bir enzimdir. Kan basıncı düşük olduğunda, böbrek afferent arteriyolünün jukstaglomerüler hücreleri tarafından renin sentezlenir. Kanda renin, daha sonra karaciğer tarafından salınan anjiotensinojeni anjiotensin I'e dönüştürür (Wu vd., 2017; Arendse vd., 2019). Renin-anjiotensin sisteminde önemli bir enzim olan ACE, anjiotensin I'i güçlü bir vazokonstriktör olan anjiotensin II'ye dönüştürerek kan basıncını yükseltir. Ayrıca kallikrein-kinin sisteminde ACE bir vazodilatör olan bradikininin inaktive edilmesini sağlar. Anjiotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2), vazokonstriktör anjiotensin II bileşiğini anjiotensin (1-7) bileşiğine hidrolize ederek kan basıncını düşürür. Böylece ACE2 enzimi tarafından anjiotensin II bileşiği miktarı azaltılarak kan basıncı dengelenir (Wu vd., 2017; Arendse vd., 2019; Fountain vd., 2023).

ACE enzimi, birçok vasküler endotel hücrede ve proksimal tübüllerin fırça kenarlı zarları dahil olmak üzere çeşitli diğer hücrelerin zarlarında bulunur. ACE, peptid substratlarının karboksil (C) ucundan dipeptidleri çıkaran bir peptidil dipeptidaz olarak çalışır. Birincil substratı anjiotensin I bileşiğidir. ACE, kardiyovasküler fonksiyon ve sıvı ve elektrolit homeostazının düzenlenmesinde çok önemli roller oynar. ACE ayrıca bradikininin inaktif parçalara indirgeyerek endojen vazodilatörlerin serum seviyesini düşürür. ACE enziminin böbrek içindeki lokalizasyonu, insanlar ve yaygın olarak kullanılan deney hayvanları arasında farklıdır. İnsan böbrekleri ağırlıklı olarak ACE'yi proksimal tübüllerin fırça sınırında bulunduruken, rat böbrekleri bunu yoğun bir şekilde renal mikrovaskülatürün endotel hücrelerinde bulundurur (Metzger vd., 1999; Yim ve Yoo, 2008).

ACE, anjiotensin I'in C-terminalindeki iki amino asidi parçalayarak anjiotensin II üretir. Anjiotensin II, kan basıncı, hacim regülasyonu ve aldosteron sekresyonu dahil olmak üzere RAS'ın fizyolojik etkilerinin birincil aracısıdır. Anjiotensin II'nin dolaşımdaki yarı ömrü çok kısadır, 60 saniyeden azdır. Peptidazlar onu anjiotensin III ve IV'e indirger. Anjiotensin III'ün, anjiotensin II'nin aldosteron uyarıcı etkisinin

%100'üne, ancak baskı etkilerinin %40'ına sahip olduğu belirlenmiştir (Guo vd., 2001; Yatabe vd., 2011).

Anjiotensin II'nin hücre dışı hacim ve kan basıncı düzenlemesi üzerindeki fizyolojik etkilerine beş yol aracılık eder:

- 1-Arteriyollerde vasküler düz kasın kasılmasıyla vazokonstriksiyon
- 2-Zona glomerülozadaki adrenal korteksten aldosteron salgılanması. Buna CYP11B2'nin (aldosteron sentaz) transkripsiyonu aracılık eder
- 3-Proksimal kıvrımlı tübülde (PCT) Na-H antiporterinin artan aktivitesi yoluyla sodyum geri emilimini artırır
- 4-Merkezi sinir sisteminden sempatik çıkışın artmasını sağlar
- 5-Hipotalamustan vazopressin salınımını uyarır

Anjiotensin II ayrıca birçok patofizyolojik durumda da rol oynar ve oksidatif stres, vasküler düz kas kasılması, endotel disfonksiyonu, fibroz ve hipertrofik etkilere neden olduğu bilinmektedir. Anjiotensin II, bu etkiler ile hipertansiyon, aterosklerotik hastalık, kalp yetmezliği ve böbrek hastalığının patogeneğinde rol oynamıştır (Harrison-Bernard, 2009; Mehta ve Griendling 2007; Xu vd., 2017; Fountain vd., 2023).

Sistemik RAS'taki anjiotensin metabolitlerinin ana vazoaktif peptidi olan anjiotensin II, aşağı yönlü fizyolojik ve patofizyolojik etkilerini ağırlıklı olarak kardiyovasküler sistemde her yerde bulunan anjiotensin II tip 1 reseptörü (AT₁R) aracılığıyla ortaya çıkarır. AT₁R'ye bağlanma, vazokonstriksiyon ve aldosteron salgılanması ile sonuçlanır. Bu durum da tuz ve su tutulmasına yol açarak arteriyel kan basıncının artmasına neden olur. RAS, negatif bir geri besleme döngüsü tarafından düzenlenir; bu sayede anjiotensin II, jukstaglomerüler hücrelerle doğrudan etkileşime girerek renin gen transkripsiyonunu ve renal renin sekresyonunu azaltır. Anjiotensin II ayrıca anjiotensin II tip 2 reseptörüne (AT₂R) bağlanarak vazodilatör etkilere aracılık edebilir. AT₂R'nin anjiotensin II tarafından uyarılması, AT₁R yoluyla anjiotensin II'nin neden olduğu vazokonstriksiyon ve anti-natriürezin tersine, vazodilatasyon ve natriürece yol açar (Arendse vd., 2019).

1.3 Anjiotensin Konverting (Dönüştürücü) Enzim İnhibitörleri

Anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri, hem hipertansif hem de normotansif deneklerde ortalama arteriyel kan basıncının yanı sıra sistolik kan basıncı (SKB) ve diyastolik kan basıncını (DKB) etkili bir şekilde düşürür. Anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri, çok sayıda kontrollü çalışmada antihipertansif ilaçlar olarak kullanılmıştır. 2014 yılında, yetişkinlerde yüksek tansiyon tedavisi için kanıta dayalı kılavuzlar Sekizinci Ortak Ulusal Komisyon (JNC8) tarafından yayınlanmıştır ve bu kılavuzda, ACE inhibitörlerin hipertansiyonu olan yetişkinler için başlangıç tedavisi olarak dört ilaç sınıfından biri olarak önerilmiştir (James vd., 2014; Messerli vd., 2018). Diğer üç ilaç sınıfı, başlangıç tedavisi olarak yararlı olan diüretikler, kalsiyum kanal blokerleri ve anjiotensin reseptör blokerleridir. Kan basıncı yüksek olan genel siyah popülasyon için başlangıç tedavisi olarak yalnızca tiazid ve kalsiyum kanal blokerleri önerilir. Amerikan Kalp Derneği/Amerikan Kardiyoloji Koleji (AHA/ACC) ve Avrupa Kardiyoloji Derneği (ESC) tarafından yayınlanan yeni kılavuzlar da, özellikle diabetes mellitus ve kardiyovasküler hastalıkları olan hastalarda birinci basamak antihipertansif tedavi olarak ACE inhibitörlerini önermektedir. ACE inhibitörleri genellikle çok etkili antihipertansif ilaçlar olmakla birlikte, klinik pratikte hipertansif siyah ırk bireylerde beyazlara göre daha az etkili oldukları kanıtlanmıştır (Page, 2014; Williams vd., 2018; Herman vd., 2023).

ACE inhibitörleri; art yük, ön yük ve sistolik duvar stresini azaltarak kalp yetmezliğini iyileştirir, bu da kalp hızında herhangi bir artış olmaksızın kalp debisinin artmasına neden olur. ACE inhibitörleri, renal kan akışını artırarak ve aldosteron ve antidiüretik hormon üretimini azaltarak tuz atılımını teşvik etmede önemli bir rol oynar. ACE inhibitörleri art yükü azaltmanın yanı sıra kardiyak miyosit hipertrofisini de azaltır. 1980'lerden bu yana, birkaç büyük, randomize, plasebo kontrollü çalışmada, ACE inhibitörleri ile tedavinin, özellikle ejeksiyon fraksiyonu azalmış kalp yetmezliği olan hastalarda genel mortaliteyi azalttığını kanıtlanmıştır. Bu çalışmalar, ACE inhibitörlerinin sol ventrikül disfonksiyonu olan asemptomatik hastalarda bile mortaliteyi azalttığını göstermiştir. Yukarıda belirtilen kanıtlara dayanarak, kalp yetmezliği olan hastalarda ilk basamak tedavi olarak ACE inhibitörleri şiddetle tavsiye edilir (Pfeffer vd., 1992; Williams vd., 2018; Herman vd., 2023).

Anjiotensin II, prekapiller arteriyollerin ve postkapiller venüllerin doğrudan vazokonstriksiyonuna neden olur, norepinefrin geri alımını inhibe eder. Anjiotensin II adrenal medulladan katekolaminlerin salınımını uyarır, idrarla sodyum ve su atılımını azaltır. Aynı zamanda, bu bileşik aldosteronun sentezini ve salınımını uyarır ve hem vasküler düz kas hücrelerinin hem de kardiyak miyositlerin hipertrofisini uyarır (Bell ve Madri, 1990).

ACE inhibitörlerinin kesin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Renin-anjiotensin-aldosteron sistemine müdahale ederler, ancak etkileri kandaki renin seviyeleri ile doğrudan ilişkili değildir. Adından da anlaşılacağı gibi, ACE inhibitörleri, anjiotensin II oluşumunu azaltarak ACE enzimini bloke eder. Azalan anjiotensin II üretimi natriürezi arttırır, kan basıncını düşürür ve düz kas ve kalp miyositlerinin yeniden şekillenmesini önler. Düşürülmüş arteriyel ve venöz basınç, ön yükü ve art yükü azaltır. Ayrıca hipotez, ACE inhibitörlerinin vazodilatasyona neden olan bir peptid olan bradikinin yıkımına müdahale etmesidir (Timmermans vd., 1993). Anjiotensin konverting enzim, bradikininin vazodilatör özelliği ile anjiotensin II'nin vazokonstriktif özelliği arasındaki dengeyi düzenler. ACE inhibitörleri, anjiotensin II oluşumunu ve bradikinin yıkımını azaltarak bu dengeyi değiştirir (Cascieri vd., 1984; Herman vd., 2023).

1.4 Hipertansiyon (Yüksek Kan Basıncı)

Hipertansiyon genellikle aşırı yüksek kan basıncı (sistolik ve diyastolik değerler sırasıyla ≥ 140 mmHg ve ≥ 90 mmHg) olarak kendini gösteren, kan damarlarının yetersiz gevşemesi ve kan akışının azalması ile karakterize kronik bir hastalıktır. Tedavi edilmediği takdirde, hipertansiyon hayati organlara yetersiz kan akışına yol açabilir, bu da felç ve sonunda ölüme neden olabilir. İnsan kan basıncı esas olarak iki kritik öneme sahip proteaz olan renin ve anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) tarafından sürdürülen renin-anjiotensin sistemi (RAS) tarafından düzenlenir. Renin (EC 3.4.23.15), fizyolojik olarak aktif olmayan bir anjiotensin I üretmek için anjiotensinojenin Leu10-Val11 peptid bağımlı hidrolize eden 37-kDa'lık bir enzimdir (Imai ve ark. 1983; Acharya vd., 2003). ACE daha sonra damar duvarındaki reseptörlerle bağlanarak kan damarı kasılmalarına neden olan vazoaktif bir anjiotensin II'yi (bir oktapeptid) oluşturur.

Hastalık durumlarında, kanda anormal derecede yüksek anjiotensin II seviyelerine neden olan ve aşırı kan damarı kasılmasına ancak yetersiz gevşemeye yol açan artmış renin veya ACE aktivitesi vardır. ACE ayrıca kan damarı gevşeme yetersizliğine katkıda bulunan bradikinin (bir vazodilatör peptid) ayırır ve etkisiz hale getirir. RAS yolunda olduğu gibi, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) tarafından nitrik oksit (NO) üretimi, normal kan basıncını korumak için önemli bir mekanizmadır (Flack vd., 1996, Bremner 2002; Aluko, 2015).

Hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıkların en önemli nedeni olarak yer almaktadır. Küresel ortalama kan basıncı antihipertansif ilaçlar nedeniyle son yıllarda sabit kalmasına rağmen, hipertansiyon prevalansı artmaya devam etmiştir. Ek olarak, son yirmi yılda genç popülasyonlarda hipertansiyonda artış eğilimi de gözlenmiştir. Bu nedenle, hipertansiyon küresel bir sağlık sorunu olarak kabul edilir. Hipertansiyonun neden olduğu kardiyovasküler hastalıklar dünya çapında mortaliteye en fazla katkıda bulunduğundan, hipertansiyon ve diğer komplikasyonlarla ilişkili sağlık hizmetlerinin maliyeti sosyal ekonomik bir yük haline gelmiştir (Dahlöf, 2010). Ayrıca sentetik antihipertansif ilaçların uzun süreli kullanımının her zaman yan etkileri vardır. Bu nedenle, hipertansiyonu yönetmek için daha az yan etki ve daha düşük maliyetle yeni stratejiler geliştirmek gereklidir. Diyet ve doğal ürünler kullanarak yüksek tansiyonu kontrol etmenin oldukça teşvik edildiği konusunda bir fikir birliği vardır. Peptidler, fitokimyasallar, bitkiler ve antioksidan bileşikler önerilen doğal ürün sınıfı içindeki tipik örneklerdir (Cicero vd., 2019; Borghi vd., 2020).

1.5 Biyoaktif Peptidler

İki amino asit molekülünün peptid bağı ile kovalent bağlanması sonucu oluşan bileşiğe dipeptid denir. Bu peptid bağı, bir amino asidin α -karboksil grubu ile diğer aminoasidin α -amino grubu arasında suyun uzaklaşması ile (dehidratasyon) oluşur. Peptid bağı, canlı hücrelerindeki tepkime sınıfı olan kondenzasyon tepkimesi için çok önemli bir örnek reaksiyondur. Tepkime dengesi, standart biyokimyasal koşullarda ürün yerine tepkimeye girenler tarafına kayar. Bu tepkime termodinamik olarak oldukça uygundur. Bu reaksiyonda karboksil grubu kimyasal olarak aktif hale gelir ve hidroksil grubu uzaklaşır (Nelson ve Cox, 2005; Möller vd., 2008).

Proteinler polipeptid moleküllerinden oluşur veya çok sayıda polipeptid alt birimi bulundurulur. Peptidler kısa, polipeptidler/proteinler ise uzun bileşiklerdir. Proteinler sentezlenirken her amino asit, bir diğer amino asite sürekli bağlanarak polipeptid zincirlerini oluşturur. Polipeptid yapısına katılan amino asitlerin her biri bu yapıya peptid bağları ile bağlanır. Peptid bağı, amino asit kalıntılarının birinin amino grubu ile diğer aminoasit kalıntısının karboksil grubu, arasından bir su molekülü çıkması ile oluşur (Nelson ve Cox, 2005; Fields vd., 2009).

Bir peptiddeki amino asit birimi sıklıkla kalıntı olarak adlandırılır (amino grubundan bir hidrojen ve karboksil grubundan bir hidroksilini kaybettikten sonra geriye kalan kısım). Biyolojik olarak aktif peptid ve polipeptidler için molekül ağırlıklarının işlevleriyle ilişkilendirecek bir genelleme yapılamaz. Hatta en küçük peptidler, biyolojik olarak önemli etkilere sahip olabilir (Nelson ve Cox, 2005).

Birçok ufak peptid çok düşük derişimlerde etkisini gösterir. Örneğin, çok sayıda omurgalı hormonu küçük peptidlerdir. Bunlar arasında oksitosin arka hipofizden salınan ve uterus kasılmasını uyaran dokuz aminoasit kalıntısından oluşmuş bir hormondur. Tirotropin salgılatıcı tripeptid hipotalamusta oluşur ve bir başka hormon olan tirotropinin salınımını uyarır (Nelson ve Cox, 2005).

Biyoaktif peptidler (BP), amino asitlerin peptid bağları ile oluşturdukları organik maddelerdir. Bazı BP doğal kaynağında serbest bulunur. Bazı BP kimyasal sentezle hazırlanır. Biyoaktif peptidler; bağışıklık, kardiyovasküler, endokrin, sinir ve sindirim sistemlerini etkileyerek insan sağlığında çok önemli bir rol oynar. BP, biyolojik olarak düzenleyici ve aktif bileşikler olarak kabul edilir. Aynı zamanda çeşitli hastalıkların tedavisinde biyoaktif peptidlerin iyileştirici etkisi ile yaşam kalitesi artırılabilir. Biyoaktif peptidler bilimsel topluluğun ve gıda endüstrisinin ilgisini çekmiş ve bu peptidlere dayanan yeni gıda katkı maddeleri ve fonksiyonel ürünlerin geliştirilmesini araştırmaya teşvik etmiştir (Shrikant vd., 2011; Sánchez ve Vázquez, 2017).

Son yıllarda, kan basıncını kontrol etmek için en başarılı strateji, anjiotensin konverting enzimin (ACE) inhibisyonu olmuştur. Kimyasal olarak sentezlenen ACE inhibitörleri (kaptopril, enalapril, ramipril ve trandolapril); kalp yetmezliği olan hastalarda ve yakın zamanda miyokard enfarktüsü ve kalp yetmezliği veya belirgin sol ventrikül disfonksiyonu olan hastalarda mortaliteyi azaltmak için klinik olarak yaygın kullanılmaktadır. Önleyici ve terapötik ilaçlara ek olarak, kardiyovasküler tedavi ve

önlemeye katkıda bulunabilecek doğal bileşikler tanımlanmıştır. Süt, soya veya balık gibi çok sayıda bitki ve hayvan proteininden türetilen ACE inhıbe edici peptidler, tedavi edici bileşenlerin kaynakları olarak belirlenmiştir. Bu ACE inhıbe edici peptidler, sırasıyla gıda işleme ve gastrointestinal sindirim sırasında *in vitro* ve *in vivo* olarak öncü proteinlerden enzimatik olarak salınabilir. ACE inhibitörleri anjiotensin II'nin vazokonstriktör etkilerini sınırlandırarak ve bradikininin vazodilatör etkilerini güçlendirerek kan basıncını düşürürler. ACE inhıbe edici özelliklere sahip peptidleri içeren çeşitli ürünler şu anda piyasada veya geliştirme aşamasındadır (De Leo vd., 2009; Kim vd., 2012).

Biyoaktif peptidler (BP), vücut fonksiyonları üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir (Singh vd., 2014). Bu bileşikler antioksidan, antimikrobiyal, antitrombotik, antihipertansif, opioid, immünomodölatör, özellikleri ile hormon veya ilaç benzeri aktiviteler sergilerler (Walther ve Sieber, 2011; Sánchez ve Vázquez, 2017).

Antihipertansif peptidler, sentetik ACE inhibitörlerinin doğal alternatifleridir. Sentetik inhibitörler kuru öksürük, baş dönmesi, baş ağrısı ve yorgunluk gibi hafif veya şiddetli yan etkilere neden olabilir. Biyoaktif peptidlerin ACE inhibitör aktivitesi, sentetik ACE inhibitörlerinden daha düşük olmasına rağmen, daha az yan etki ile daha güvenlidirler, daha az maliyetlidirler ve esansiyel amino asitlerin kaynağı olarak ek besinsel faydalar sağlarlar (Iwaniak vd., 2014; Gobbetti vd., 2002).

2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

Yapılan bir çalışmada, anjiotensin konverting enzim (ACE) enziminin insan akciğerinden 2660 kat saflaştırılmıştır. EDTA, SQ 20.881 ve SQ 14.225 bileşikleri ACE enzimini güçlü bir şekilde inhibe etmiştir ve CoCl_2 ise ACE aktivitesini artırmıştır. Hippuril-histidil-lösin (HHL) substratı ile K_M 1.6 mM olarak hesaplanmıştır. Sükroz yoğunluk gradienti santrifüjleme yöntemi ile ACE enziminin molekül ağırlığı 150 kDa olarak bulunmuştur. Daha sonra SDS-PAGE ile ACE enziminin molekül ağırlığı 130 kDa olarak bulunmuş ve tek bir polipeptid zincirine sahip olduğu tespit edilmiştir (Friedland vd., 1981).

Anjiotensin konverting enzim, domuz böbrek ve striatumundan lisinopril ligandı kullanılarak afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Bu yöntem ile striatumdaki ACE enziminin iki formu (180 kDa ve 170 kDa), böbrekteki ACE enziminin ise sadece tek formu (180 kDa) izole edilmiştir. Kimyasal ve enzimik deglikolizasyon işlemlerinden sonra böbrek ve striatumdaki ACE enzimlerinin molekül ağırlığı, SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile 150 kDa olarak bulunmuştur (Hooper ve Turner, 1987).

Başka bir çalışmada, ACE afinite kromatografisi yöntemi ile insan plazmasından tek basamakta 5367 kat saflaştırılmıştır. Saf ACE enziminin saflığı ve moleküler ağırlığı, SDS-PAGE ile belirlenmiştir ve jel üzerinde 60 kDa ve 70 kDa olarak iki bant görülmüştür. Okside glutatyon (GSSG) ve redükte glutatyon (GSH) bileşiklerinin ACE aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. GSSG, ACE enzimi üzerine aktivasyon etkisi göstermiştir. GSH ise inhibisyon etkisi göstermiştir. GSH ve lisinopril için IC_{50} değerleri sırasıyla 16.2 μM ve 0.781 nM olarak hesaplanmıştır. GSH ve lisinopril için K_i sabitleri sırasıyla 11.7 μM ve 0.662 nM olarak bulunmuştur (Basi ve Turkoglu, 2019).

Renin-anjiotensin sistemindeki ACE kan basıncını düzenleyen çok önemli bir enzimdir. Bir çalışmada, ACE koyun akciğerinden saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Spesifik bir ACE inhibitörü olan kaptoprilin inhibisyon etkisi belirlenmiştir. ACE, afinite kromatografisi ile koyun akciğerinden 6405 kat saflaştırılmıştır. ACE enziminin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile bulunmuştur ve jel üzerinde 60 kDa ve 70 kDa civarında iki bant gözlenmiştir. Saflaştırılmış ACE için optimum pH ve optimum sıcaklık belirlenmiştir. Optimum pH ve sıcaklık sırasıyla pH 7.4 ve 40 °C olarak bulunmuştur. V_{max} ve K_M değerleri sırasıyla 35.59 ($\mu\text{mol/dk}$). mL^{-1} ve 0.18 mM olarak

hesaplanmıştır. Kaptoprilin IC_{50} değeri 0.51 nM olarak bulunmuştur. Kaptoprilin inhibisyon tipi, Lineweaver-Burk grafiğinden yarışmasız inhibitör olarak belirlenmiş ve K_i değeri 0.39 nM olarak hesaplanmıştır (Aydın vd., 2021).

Spontan hipertansif ratların (SHR) domuz derisi kollajeninin enzimatik hidrolizatı ile sürekli oral beslenmesi, antihipertansif bir etki oluşturmuştur. Hidrolizattan bir anjiotensin I-dönüştürücü enzim (ACE) inhibe edici peptid, Gly-Phe-Hyp-Gly-Pro ($IC_{50}=91 \mu M$) izole edilmiştir. Ancak izole edilen diğer peptidlerin ACE inhibe edici aktivitelerinin zayıf olduğu gözlemlenmiştir. Gly-Pro peptidinin ($IC_{50}=360 \mu M$) ACE inhibe edici aktivitesi güçlü olmamasına rağmen, Gly-Pro kollajende çok sayıda tekrarlanan dizi olarak bulunur. Daha sonra Gly-Pro peptidinin antihipertansif etkisi incelenmiştir. 500 mg/kg'da oral olarak uygulanan Gly-Pro, SHR'lerin kan basıncını önemli ölçüde düşürmüştür ve 50 mg/kg'da ayrıca kan basıncını düşürme eğilimi göstermiştir. Gly-Phe-Hyp-Gly-Pro peptidinin (10 veya 30 mg/kg) oral uygulaması da SHR'lerin kan basıncını düşürmüştür (Ichimura vd., 2009).

Besleyici özelliklere sahip kabak çekirdeği proteinleri, son yıllarda yararlı etkileri olan yenilikçi bir biyoaktif peptid kaynağı olarak büyük ilgi görmüştür. Yapılan bir çalışmada, kabak çekirdeği proteinlerinden yeni ACE inhibe edici peptidlerinin in silico yaklaşımıyla taranması ve altta yatan inhibisyon mekanizmalarının daha fazla aydınlatılması amaçlanmıştır. Kabul edilebilir biyoyararlanım özelliklerine sahip yeni bir tripeptid olan IAF (Ile-Ala-Phe), $19.87 \pm 0.50 \mu M$ 'lik bir IC_{50} değeri ile önemli ölçüde ACE inhibe edici etkisi sergilemiştir. Moleküler yerleştirme çalışması, IAF peptidinin ACE enziminin aktif bölgesindeki anahtar kalıntılarla bağlanabileceğini göstermiştir. Daha fazla moleküler dinamik simülasyonu, simülasyon sistemlerinin 5 ns (simülasyon süresi) sonra dengeye ulaştığını ve ACE enzimi ve IAF'nin stabilizasyonda kompleks oluşturabileceğini öne sürmüştür. Sonuç olarak, kabak çekirdeği proteinlerinden elde edilen yeni ve potansiyel ACE inhibitör peptid IAF'nin, hipertansiyonu kontrol etmek için umut verici bir aday olabileceği belirlenmiştir (Liang vd., 2021).

ACE enzimine karşı stabilite çalışması ve ACE inhibisyon kinetiği çalışmaları için hurma çekirdeği keki proteinlerinin hidrolizatından üç yeni peptid YGIKVGYAIP, GGIF ve GIFE elde edilmiştir. Sonuçlar, peptid YGIKVGYAIP peptidinin bozulduğunu ve ACE ile 3 saat ön inkübasyondan sonra ACE inhibe edici aktivitesinin azaldığını,

buna karşılık GGIF ve GIFE peptidlerinin dirençli olduğunu göstermiştir. YGIKVGYAIP ve GGIF substrat tipindeyken, GIFE gerçek inhibitör tipidir. ACE aktivitesi üzerine inhibitör etkisi gösteren üç biyoaktif peptidin YGIKVGYAIP, GGIF ve GIFE için IC_{50} değerleri sırasıyla 1.0 μM , 92 μM ve 3.0 μM olarak hesaplanmıştır. Ayrıca peptidlerin ACE'ye karşı inhibisyon kinetikleri araştırılmıştır ve K_i değerleri sırasıyla 0.054 mM, 1.27 mM ve 18 mM olarak bulunmuştur (Zarei vd., 2022).

Gıda proteinlerinden türetilen biyoaktif peptidler, çeşitli fizyolojik rollere sahiptir ve son yıllarda çok fazla ilgi çekmektedir. Bir çalışmada, *in silico* yöntemleri kullanılarak tavşan eti proteinlerinden taranan iki yeni ACE inhibitör peptidi (EACF ve CDF), güçlü *in vitro* inhibitör etkiler sergilemiştir. EACF ve CDF, sırasıyla $41.06 \pm 0.82 \mu M$ ve $192.17 \pm 2.46 \mu M$ 'lik IC_{50} konsantrasyonları ile sırasıyla kompetitif ve non-kompetitif inhibitörler olduğu belirlenmiştir. Moleküler yerleştirme deneyleri, EACF'nin S1 ve S2 ceplerinde sekiz H-bağı etkileşimi ve Zn 701 ile bir metal-alıcı etkileşimi oluşturduğunu ortaya çıkarmıştır. CDF, ACE'nin S1 cebinde dört H-bağı etkileşimini paylaşmıştır. Sonuçlar, tavşan eti proteinlerinin ACE inhibe edici peptidlerin hazırlanması için uygun bir materyal olabileceğini ve sanal taramanın yeni aktif peptidlerin keşfi için etkili, doğru ve umut verici bir yöntem olduğunu öne sürmüştür (Chen vd., 2022).

Channa striatus, birçok sağlık işlevine sahip yüksek proteinli bir besindir. Yapılan bir çalışmada; yanıt yüzeyi metodolojisi, biyoafinite ultrafiltrasyonu ve moleküler yerleştirme ile *Channa striatus* hidrolizatlarından ACE inhibisyon peptidlerinin hazırlanması, taranması ve tanımlanması amaçlanmıştır. ACE inhibisyon peptidlerini hazırlamak için en uygun koşullar belirlenmiştir. Yerleşik yüksek verimli tarama yaklaşımı aracılığıyla yedi yeni ACE inhibitör peptidi taranmıştır; aralarında EYFR ve LPGPGP, sırasıyla 179.2 ve 186.3 μM IC_{50} değerleri ile en güçlü ACE inhibisyonunu göstermiştir ($P > 0.05$). Moleküler yerleştirme, sırasıyla ACE ve LPGPGP ve EYFR arasında üç ve on hidrojen bağının oluştuğunu, S1 ve S2'nin ana aktif cepler olduğunu, ancak ana itici güçlerin değiştiğini ortaya çıkarmıştır (Ma vd., 2021).

Hipertansiyon ciddi bir küresel sağlık sorunu olarak ortaya çıkmış ve tüm dünyada akademisyenlerin ilgisini çekmiştir. ACE enzimine karşı protein kaynaklarından üretilen doğal biyoaktif inhibitör peptidler, sentetik ilaçlarla

karşılaştırıldığında güvenli olmaları nedeniyle araştırılmaları ve geliştirilmelerinde önemli bir artış olmuştur. *Spirulina platensis*, su ürünleri yetiştiriciliğinde yaygın olarak bulunan bir siyanobakteridir. Yapılan bir çalışmada, *Spirulina platensis* protein hidrolizatlarından yeni ACE inhibe edici peptidler izole edilmiştir. Bu peptidler kütle spektrumu analizi ve ACE inhibitör aktivite testi ile tanımlanmıştır. Sonuçlar, iki yeni ACE inhibitör peptidlerinin Val-Thr-Tyr (VTY) ve Leu-Gly-Val-Pro (LGVP) elde edildiğini göstermiştir. Bu peptidlerin IC_{50} değerleri sırasıyla 23.39 μ M ve 45.76 μ M olarak hesaplanmıştır. Moleküler yerleştirme analizi, VTY peptidinin esas olarak ACE'nin S1 ve S2 aktif ceplerine hidrojen bağları yoluyla bağlandığını, LGVP peptidinin ise S1 cebi ile yalnızca kısmen etkileşime girdiğini göstermiştir (Zhang vd., 2022).

Maca, antihipertansif aktiviteye sahip yenilebilir fonksiyonel bir bitkidir. Bir çalışmada, altı yeni ACE inhibitörü peptidi (RSRGVFF, LGHPVFRNK, HGSCNYR, KANLGFRF, GGGHKRLY ve SSYLGRN), in silico araçları ve moleküler yerleştirme kullanılarak maca protein hidrolizatlarında bulunmuştur. ACE enzimi üzerine inhibitör etkisi gösteren RSRGVFF peptidi için IC_{50} değeri 5.01 μ M olarak hesaplanmıştır. Yapı-aktivite bağlantısının bir analizi, N-terminalindeki arginin aminoasidinin RSRGVFF'deki en olası aktif kalıntı olduğunu ve C-terminalindeki iki fenilalaninin aminoasitlerinde inhibitör aktivitesine katkıda bulunduğunu göstermiştir. Dolayısıyla bu sonuçlar, maca proteininin antihipertansif aktiviteye yol açan maddelerden biri olabileceğini göstermektedir (Lin vd., 2023).

Mısır glütenu, sırasıyla % 28.7 ve % 67.7'lik hidroliz derecesi ve protein geri kazanımı ile Alcalase tarafından hidrolize edilmiştir. Ultrafiltrasyon, 3–10 kDa'lık bir fraksiyonun (IC_{50} =15.98 μ g/mL) güçlü ACE inhibe edici peptidler içerdiğini ortaya çıkarmıştır. Fraksiyondaki peptidler ayrıca boyut dışlama kromatografisi ve ters fazlı kromatografi ile ayrılmıştır. Yeni peptid DLLGCS'nin en aktif ACE inhibitörü olduğu belirlenmiştir (IC_{50} =39.0 μ M). In silico sindirim sonucu oluşan peptid CS, ana muadilinden yaklaşık 4.5 kat daha yüksek çıkmıştır (IC_{50} =8.5 μ M). Peptidler CS ve DLLGCS, sırasıyla 12.52 ve 11.40 μ M K_i değerleri ile unkompetitif bir inhibitör özelliği göstermiştir (Wongngam vd., 2023).

Yüksek protein içeriğine sahip küçük aromalı tavuk, Çin'in Yunnan-Guizhou Platosu'nun dağlık bölgesinde yaygındır. Yapılan bir çalışmada, küçük aromalı tavuk

göğsünden üç yeni ACE inhibe edici peptid Leu-Thr-Glu-Lys-Val-Val-Phe (LTQKVVF), Leu-Asp-Asp-His-Phe-Leu (LDDHFL) ve Val-Pro-Gly-Pro-Glu-Pro-Lys-Pro (VPGPEPKP) elde edilmiştir. Kullanılan saflaştırma ve tanımlama protokolü, iyon değiştirme kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi, RP-HPLC ve nano sıvı kromatografisi-elektrosprey iyonizasyon-tandem kütle spektrometrisi (Nano-LC-ESI-MS/MS) kapsamaktadır. VPGPEPKP ve VPPGEPKP ile karşılaştırıldığında, LTQKVVF, 189.34 μM IC_{50} değeri ile yüksek ölçüde bir ACE inhibe edici aktivite sergilemiştir. Lineweaver-Burk grafikleri ile LTQKVVF ve LDDHFL peptidleri karışık kompetitif inhibitör etkisi gösterirken, VPGPEPKP peptidi unkompetitif inhibisyon benzeri bir etki göstermiştir (Han vd., 2023).

Yapılan bir çalışmada, NaCl'nin KCl ile kısmi yer değiştirmesi ile domuz soşisinin *in vitro* sindirim ürünlerinden ACE inhibitör peptidleri tanımlanmıştır. KCl 'nin *in vitro* sindirim ürünlerinden elde edilen peptidler, de novo dizileme ile birleştirilmiş tandem kütle spektrometrisi analizi ile sıvı kromatografisi kullanılarak tanımlanmıştır. Daha sonra, ACE inhibe edici peptidler PeptideRanker, *in silico* absorpsiyon ve moleküler yerleştirme temelinde LIVGFPAYGH ve IVGFPAYGH olarak belirlenmiştir. Ek olarak, bu ACE inhibitör peptidleri karışık tip inhibitörler olarak belirlenmiş ve bu peptidlerin IC_{50} değerleri sırasıyla 196.16 ve 150.88 μM olarak bulunmuştur (Zou vd., 2023).

Hipertansiyon gibi kronik hastalıklar insan sağlığına büyük zararlar vermektedir. Geleneksel ilaçlar ümit verici terapötik etkilere sahiptir, ancak aynı zamanda önemli yan etkilere de neden olur. Gıda kaynaklı anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibe edici peptidler, daha az yan etkiye sahip oldukları için farmasötiklere mükemmel bir terapötik alternatiftir. Ancak, ACE inhibitör peptidler için sistematik ve etkili bir tarama yöntemi yoktur ve bu inhibitör peptidlerin sekans özelliklerinin ve moleküler mekanizmasının anlaşılabilmesi, ACE inhibitör peptidlerin geliştirilmesinde büyük bir engel oluşturmaktadır. Yapılan bir çalışmada, 160.000 tetrapeptidin ACE ile bağlanma etkileri moleküler kenetleme ile sistematik olarak hesaplanarak, Tyr, Phe, His, Arg ve özellikle Trp'ye sahip peptidlerin, ACE inhibe edici peptidlerin karakteristik amino asitleri olduğu belirlenmiştir. WWNW, WRQF, WFRV, YYWK, WWDW ve WWTY tetrapeptidleri, $19.98 \pm 8.19 \mu\text{M}$ ve $36.76 \pm 1.32 \mu\text{M}$ arasında IC_{50} değerleri ile önemli

ölçüde yüksek ACE inhibe edici davranışlar gösteren ilk 10 peptid arasında yer almıştır (Ma vd., 2023).

Yapılan bir çalışmada, pirinç yan ürünlerinin yüksek değerli kullanımını gerçekleştirmek için, pirinç kepeği proteini hidrolizatı ayrılmıştır ve ultrafiltrasyon ve RP-HPLC ile saflaştırılmıştır. Daha sonra peptid dizileri LC-MS/MS ile sıvı kromatografisi kullanılarak tanımlanmıştır ve moleküler yerleştirme analizleri ve *in vitro* ve hücre içindeki aktiviteler gerçekleştirilmiştir. ACE inhibitör aktivitesi gösteren iki yeni peptidin FDGSPVGY ve VFDGVLRPGQ IC₅₀ değerleri sırasıyla 0.079 mg/mL (94.05 µM) ve 0.093 mg/mL (85.59 µM) olarak hesaplanmıştır (Zhang vd., 2023).

Nar (*Punica granatum* L.), yüksek düzeyde antioksidan polifenolik maddeler içermesi nedeniyle sağlık üzerine sayısız yararları olduğu gözlemlenmiştir. Nar ekstraktının ACE enzimini inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Ancak narın temel ana bileşenlerinin çoğunun ACE'ye karşı potansiyel inhibe edici etkisi bilinmemektedir. Bu nedenle, çoğunluğu ACE'yi önemli ölçüde inhibe eden 24 ana bileşiğin aktivitelerini test edilmiştir. Pedunculagin, punicalin ve gallagic asit, sırasıyla 0.91, 1.12 ve 1.77 µM IC₅₀ değerleri ile en etkili ACE inhibitörleri olarak belirlenmiştir. Moleküler yerleştirme çalışmalarında, bu bileşiklerin ACE'nin C- ve N-alanlarında katalitik kalıntılar ve çinko iyonları ile çoklu hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler oluşturarak ACE'nin katalitik aktivitesini inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Ali vd., 2023).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

İnsan serumu elde etmek için Van Kızılay Kan Merkezi'nden kan alındı. Toplanan kan yarım saat kadar pıhtılaşması için bekletildikten sonra santrifüj tüplerine eklendi. İnsan kanı oda sıcaklığında 2500 x rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz sarı renkli serum dikkatli bir şekilde kandan ayrıldı.

3.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan GP, RGDS, SDGRG, lisinopril NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow, HepesNa (2-[4-(2-hidroksietil) piperazin-1-il] etan sülfonik asit sodyum), FAPGG (N-[3-(2-Furil) akrilolil]-Fenil-Glisil-Glisin), ZnCl₂ (çinko klorür), sodyum tetra borat, serum albumin, trihidroksimetil aminometan (Tris), β-merkaptan etanol, lisinopril Sigma Chemical Comp.'den temin edildi. N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED), akrilamid, N,N'-metilen bisakrilamid, brom timol mavisi, bromfenol mavisi, sodyum dodesil sülfat (SDS), amonyum persülfat, AppliChem GmbH'den temin edildi. Sodyum klorür, hidroklorik asit, fosforik asit, sodyum azid, gliserin, etanol, metanol, asetik asit, Coomassie brilliant blue G-250, E. Merck AG'den satın alındı. Elektroforez markırı Fermentas SM0671 Life Science Thermo Fisher Scientific'ten temin edildi.

3.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Spektrofotometre: Shimadzu UV Spectrophotometer UV-1800

İnkübatör: G24 Enviromental Incubatur Shaker

Soğutmalı klinik santrifüj: Hettich Zentrifugen Universal 320 R

Klinik santrifüj: Hettich Zentrifugen Universal 320 R

Elektroforez tankı: P8DS Vertical Electrophoresis System (dikey)

Peristaltik pompa: Eyela Micro Tube Pump MP-3

Peristaltik pompa: Easy-load master flex model 7518-10

Güç kaynağı: Thermo scientific

pH metre: Inolab WTW series pH 720

Karıştırıcı (Vorteks): Mixer VM 20

Hassas terazi: Gec Avery

Hassas terazi: Shimadzu Uni Bloc AUW 220D

Afinite Kromatografisi kolonu: Sigma 1 cm x 10 cm

Otomatik pipetler: Eppendorf, Volac (5-50 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL)

Homojenizatör: Wiggen Hauser 220-240 volt 50-60 Hz

Parçalayıcı mikser: Warning Commercial Laboratory Blender. Country of origin U.S.A.

Sabit sıcaklık banyosu: Julabo Labortechnik GMBH D-7633

Sabit sıcaklık sirkülasyon banyosu: Grand Technical. Specification LTD 6G-20 to 100°C

3.1.3 Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Bütün çözeltiler bidistile su kullanılarak hazırlandı.

3.1.3.1 Protein Tayininde Kullanılan Çözeltiler

1) Coomassie brilliant blue G-250 renk reaktifi (Protein tayininde kullanılan stok çözelti): 100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 mL % 95'lik etanolde çözüldü. Bu çözeltiye 100 mL % 95'lik ortofosforik asitten yavaşça eklendi. Hazırlanan çözeltinin hacmi bidistile su ile 1 L'ye tamamlandı.

2) Standart serum albumin çözeltisi (Protein tayininde kullanılan standart çözelti): 10 mg sığır serum albumininden alınıp bir miktar destile suda köpürtülmeden yavaşça çözüldü ve hacmi bidistile su ile 10 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.2 Aktivite Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler

1) 50 mM HepesNa/0.3 M NaCl/10 µM ZnCl₂ pH 7.5: 3.254 g HepesNa, 4.38 g NaCl ve 0.00034 g ZnCl₂ alınarak 200 mL bidistile suda çözüldü. HCl çözeltisi ile pH 7.5'a ayarlandı. Daha sonra toplam hacim bidistile su ile 250 mL'ye tamamlandı.

2) 1 mM FAPGG çözeltisi: 0.01 g FAPGG alınarak % 5'lik 1250 µL metanol içinde çözüldü ve hacmi bidistile su ile 25 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.3 Kolon Dolgu Maddesi için Kullanılan Çözeltiler

1) 1 mM HCl: 0.041 mL HCl alınarak bir miktar bidistile suda çözüldü ve hacmi bidistile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

2) 0.2 M NaHCO_3 / 0.5 M NaCl/ 5mM Lisinopril pH=8.3 (Kolon dolgu maddesini ligandla birleştirmek için kullanılan tampon): 0.804 g NaHCO_3 ve 1.461 g NaCl alınarak 40 mL bidistile suda çözüldü. pH'sı 8.3'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 50 mL'ye tamamlandı. Çözeltiye 0.1104 g lisinopril eklendi ve çözelti 1 gece 4 °C de bekletildi.

3) 0.1 M Tris-HCl pH=8.5 (Kolon dolgu maddesini yıkamak için kullanılan tampon): 6.057 g Tris alınarak 450 mL bidistile suda çözüldü. HCl çözeltisi ile pH 8.5'a ayarlandı. Daha sonra toplam hacim bidistile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

4) 0.1 M K-asetat /0.5 M NaCl pH=4.5 (Kolon dolgu maddesini yıkamak için kullanılan tampon): 4.907 g K-asetat ve 14.61 g NaCl alınarak 450 mL bidistile suda çözüldü. pH 4.5'a ayarlandı. Daha sonra toplam hacim bidistile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

3.1.3.4 Afinite Kromatografisi Kolonunda Kullanılan Çözeltiler

1) 20 mM Tris/0.3M NaCl pH=8.0 (Kolonunun paketlenmesi ve dengelenmesi için kullanılan tampon): 2.423 g Tris ve 17.532 g NaCl alınarak 950 mL bidistile suda çözüldü. pH'sı 8.0'e ayarlandıktan sonra toplam hacim bidistile su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

2) 20 mM Tris/0.3M NaCl pH=8.0 (Numune tatbik ettikten sonra afinite kromatografisi kolonunun yıkanması için kullanılan tampon): 2.423 g Tris ve 17.532 g NaCl alınarak 950 mL bidistile suda çözüldü. pH'sı 8.0'e ayarlandıktan sonra toplam hacim bidistile su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

3) 50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (sodyum borat) pH'sı 9.0 (Afinite jeline tutunmuş olan anjiyotensin konverting enzimin elüsyonu için kullanılan tampon): 1.907 g sodyum borat

90 mL bidistile suda çözüldü. pH 9.0'a ayarlandı ve daha sonra toplam hacim bidistile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

4) % 0.02'lik NaN_3 (Sodyum azid) çözeltisi (Kromatografi kolon meteryallerini bakterilerden korumak için): 10 mg NaN_3 alınarak 50 mL bidistile suda çözüldü.

3.1.3.5 SDS-PAGE Elektroforez için Kullanılan Çözeltiler

1) 1.5 M Tris-HCl (pH= 8.8): 18.17 g Tris (0.1 mol) tartılarak 80 mL bidistile suda çözüldü, pH ayarı yapıldıktan sonra hacmi bidistile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

2) 0.5 M Tris-HCl (pH= 6.8): 6.057 g Tris (0.1 mol) tartılarak 80 mL bidistile suda çözüldü, pH ayarı yapıldıktan sonra hacmi bidistile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3) % 30 Akrilamid - % 2.7 Bisakrilamid çözeltisi: 14.6 g akrilamid, 0.4 g bisakrilamid 40 mLbidistile suda çözüldü ve hacmi bidistile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

4) % 10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat tartılarak bidistile su ile hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

5) % 10'luk SDS: 1 g SDS tartılarak bidistile su ile 10 mL'ye tamamlandı.

6) Yürütme tamponu: 3.028 g Tris ve14.410 g glisin tartılarak 950 mLbidistile suda çözüldü, daha sonra %10'luk SDS'den 10 mL ilave edilerek pH= 8.3'e ayarlandı ve toplam hacim bidistile su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

7) Numune tampon çözeltisi: 1.5 M Tris-HCl (pH= 6.8)'den 2.5 mL, %10'luk SDS'den 4 mL, %100'lük gliserinden 2 mL ve β -merkaptoetanolden 1 mL alınarak hacmi bidistile su ile 10 mL'ye tamamlandı.

8) Jel boyama çözeltisi: 40 mL metanol, 7 mL asetik asit içinde 0.025 g Coomassie brilliant blue R-250 reaktifi çözülerek hacim bidistile su ile 100 mL'ye tamamlandı

9) I. Jel yıkama çözeltisi: 50 mL metanol - 10 mL asetik asit - 40 mL bidistile su karıştırılarak hazırlandı.

10) II. Jel yıkama çözeltisi: 5 mL metanol - 7 mL asetik asit - 88 mLbidistile su karıştırılarak hazırlandı.

11) Su ile doyurulmuş n-bütanol: 10 mL n-bütanol ve 1mL bidistile su karıştırılarak hazırlandı.

12) % 0.1'lik brom timol mavisi çözeltisi: 0.01 g indikatör, 1 mL bidistile su içerisinde çözüldü ve toplam hacim bidistile su ile10 mL'ye tamamlandı.

3.2 Yöntem

3.2.1 Protein Tayini

3.2.1.1 Kalitatif Protein Tayini

Afinite kolonundan elde edilen fraksiyonların her birinin kalitatif protein tayinleri yapıldı. 280 nm’de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbands göstermesi esasına dayanılarak kalitatif protein tayini yapılmaktadır (Carlberg ve Mannervik, 1981). İnsan serumundan elde edilen enzim numunelerinde kalitatif protein tayini bu yöntemle göre belirlendi. Fraksiyonlar kuvarts küvetlere alınarak absorbandsları köre karşı okundu. Kör olarak elüsyon tamponu kullanıldı.

3.2.1.2 Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini

Afinite kolonundan elde edilen fraksiyonların her birinin kantitatif protein tayinleri yapıldı. Bu yöntemde o-fosforik asitli ortamda proteinler Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturmakta ve bu kompleks 595 nm’de maksimum absorbands göstermektedir. Negatif bir yüke sahip olan Coomassie Brilliant Blue G-250 bu yöntemde boya olarak kullanılır ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı (maksimum dalga boyu 465 nm) ve mavi (maksimum dalga boyu 596 nm) formu mevcuttur. Proteinin boya üzerindeki negatif yüke bağlanmasıyla kırmızı form mavi forma dönüşür. Protein-boya kompleksi çözeltilerde uzun süre kalır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg dır. Reaksiyon çok fazla tekrarlanabilir ve hızlı bir şekilde oluşur. Reaksiyon yaklaşık olarak iki dakikada tamamlanır. Renk stabilitesi yaklaşık iki saatin üzerinde devam etmektedir. Renk oluşumunda proteinin amino asit bileşiminin (özellikle arginin gibi bazik aminoasitler ile aromatik amino asitler) reaksiyon üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir (Bradford, 1976).

Ölçüm şu şekilde yapıldı; 1 mL’inde 1mg protein içeren standart sığır albumin çözeltilisinde tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alındı. Tüm tüplerin hacmi bidistile su ile 0.1 mL’ye tamamlandı. 5 mL Coomassie Brilliant Blue G-250

reaktifi tüplere ilave edilerek vorteks mikser ile karıştırıldı. 10 dk inkubasyondan sonra 595 nm’de 3 mL’lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0.1 ml aynı tampon ve 5 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifinden oluşan çözelti kullanıldı. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri kullanılarak standart grafik çizildi.

Hazırlanan enzim çözeltilerinden (her bir fraksiyondan) ayrı ayrı 0.1 mL alındı. 5 mL Coomassie Brilliant reaktifi ilave edildi ve vorteks ile karıştırılarak 10 dk inkübasyona bırakıldı. Yine kör olarak 0.1 mL aynı tampon ve 5 mL Coomassie Brilliant reaktifinden oluşan çözelti kullanılarak 595 nm’de absorbans değerleri okundu. Her bir fraksiyon için bulunan absorbans değerleri standart grafikten µg.protein değerine çevrildi.

3.2.2 Afinite Kolonunun Hazırlanması

Afinite kromatografisi yöntemi, önceden aktive edilmiş kolon dolgu maddesiyle biyospesifik ligandları birleştirerek saflaştırılma yapılmasına dayanan başarılı bir yöntemdir. NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow, mevcut kimyasallarla bağlanma seçimini artıran önceden aktive edilmiş agaroz bir matriksidir. NHS (N-hidroksisüksinimid), primer amino grupları içeren ligandlarla kimyasal olarak stabil bir amid bağı oluşturur. NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow, bir aralayıcı kol sağlar ve bu nedenle özellikle küçük protein ve peptid ligandlarının immobilize edilmesi için uygundur. NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow; 6-amino hekzanoik asit aralayıcı kol ve sepharose 4 fast flow maddesinin birleştirilmesi ile hazırlanmış yüksek derecede çapraz bağlı (boncuk şekillendirilmiş) bir pre-aktif matrikstir. Terminal karboksil grup N- hidroksisüksinimid ile esterleşerek aktive edilmiştir. Primer amino grubu içeren ligandlar kimyasal açıdan çok kararlı bir amid bağı oluşturmak için bu aktif maddeye doğrudan bağlanmaktadır. NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow yüksek aktivitesini korumak için kullanılmadan önce uzaklaştırılması gereken %100 izopropanol içinde bir süspansiyon olarak temin edilir. Kolon dolgu maddesinden izopropanolün uzaklaştırılması için talimatlar ve ligand ile birleştirmek için aşağıdaki işlemler yapıldı. Birleştirme basamağından önce ön-aktive edilmiş kolon dolgu maddesinin bağlanma kapasitesini maksimum seviyede tutmak için çözelitler soğukta (0°C’den 4°C’ye)

kullanıldı, tüm yıkama basamaklarının zaman aralığı azaltıldı ve ligandla birleştirilmeden önce tüm çözeltiler hazırlandı.

NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow (25 mL) önce 1 mM soğuk HCl ile yıkandı. Daha sonra kolon dolgu maddesinin üzerine birleştirme tamponu (0.2 M NaHCO_3 / 0.5 M, NaCl / 5mM Lisinopril) eklendi. Reaksiyon 4 °C'de bir gecede gerçekleştirildi. Birleştirme tamamlandıktan sonra, ortamdaki reaksiyona girmemiş grupların bloke edilmesi için 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) çözeltisi içinde birkaç saat bekletildi. Birleştirmeden sonra kolon dolgu maddesi iki farklı tampon (sırasıyla yüksek ve düşük pH) ile yıkandı. İlk yıkama için yaklaşık 250 mL 0.1 M Tris-HCl tamponu (pH 8.5) kullanıldı ve yıkama 4 kez tekrarlandı. Daha sonra ikinci yıkama için yaklaşık 250 mL 0.1 M asetat tamponu (pH 4.5) kullanıldı ve bu yıkama da 4 kez tekrarlandı. Bu işlemlerden sonra NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow üzerine dengeleme tamponu (20 mM Tris/0.3M NaCl, pH=8.0) eklenerek jel süspanse edildi. Süspanse edilmiş jel, 1cm x 10 cm'lik kolona yerleştirilerek paketlenildi. Kolona eklenen jel çöktükten sonra peristaltik pompa kullanılarak dengeleme tamponu ile 3 gün boyunca dengelendi. Eluat ile dengeleme tamponunun 280 nm'de absorbanlarının birbirine eşitlenmesinden kolonun dengelenmiş olduğu belirlendi. Bu şekilde afinite kolonu saflaştırma yapmak için hazır hale getirilmiş oldu.

3.2.3 İnsan Serumu Anjiotensin Konverting Enziminin Saflaştırılması

3.2.3.1 İnsan Serumu Eldesi

Bu çalışmada insan serumu elde etmek için Van Kızılay Kan Merkezi'nden kan alındı. Toplanan kan yarım saat kadar pıhtılaşması için bekletildikten sonra santrifüj tüplerine eklendi. İnsan kanı oda sıcaklığında 2500 x rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz sarı renkli serum dikkatli bir şekilde kandan ayrıldı ve daha sonraki kinetik çalışmalarda kullanılmak üzere dondurucuda saklandı (Thavasu vd., 1992).

3.2.3.2 İnsan Serumunun Afinite Kolonuna Uygulanması ve Enzim Elüsyonu

1 cm x 10 cm boyutlarındaki afinite kolonuna NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow kolon dolgu maddesi tris tamponu ile yüklendi. Kolon aynı tampon ile 20 mL/saat akış hızı ile 4 gün boyunca dengelendi. İnsan serumu tris tamponu ile dengelenmiş olan NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow afinite kolonuna peristaltik pompa kullanılarak uygulandı. İnsan serumunun tamamı kolondan geçtikten sonra kırmızı renk tamamen yok oluncaya kadar dengeleme tamponu geçirilmeye devam edildi ve bu şekilde kolonun yıkanması sağlandı. Daha sonra kolondan 20 mM Tris / 0.3 M NaCl (pH=8.0) geçirilerek yıkandı. Yıkama ise spektrofotometrik okumada absorbans değerinin 0.1 olmasıyla tamamlandı. Kolon yıkandıktan sonra elüsyon tamponu (50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, pH= 9.0) ile elüe edildi. Bu işlemlerin tümünde peristaltik pompanın akış hızı 20 mL/saat olarak ayarlandı. Bu yöntem Pantoliano metodundan modifiye edilmiştir (Pantoliano vd., 1984; Sabeur vd., 2001).

İnsan serumundan saflaştırılan ACE ile çalışılırken literatürde kullanılan optimal şartlar uygulandı. Elüsyonlar 3'er mL olacak şekilde tüplere alındı, her birinde aktivite değerleri okundu. Yüksek enzim aktivitesi gösteren tüpler birleştirildi. Birleştirilen bu tüplerden oluşan stok enzim çözeltisinin son aktivitesi belirlendi. Tüpler daha sonra gerek kinetik çalışmalar ve gerekse enzim karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere küçük porsiyonlar halinde derin dondurucuda saklandı.

3.2.4 SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile ACE'nin Saflığının Kontrolü

ACE saflaştırıldıktan sonra % 4-10 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi (Laemmli, 1970). Öncelikle elektroferez plakaları su ile ve daha sonra alkol ile iyice yıkandı. Plakaların her iki kenarında aralık oluşturuçu çubuklar kullanılarak plakalar üst üste getirildi ve kısıkaçlarla tutturuldu. Plakalar sabitleştirildikten sonra içerisinde sızdırmayı engelleyen sünger içeren jel hazırlama kabinine konuldu. Önce ayırma jeli hazırlandı ve enjektörle plakaların arasına üst kesimde 0.3 cm kalıncaya kadar dolduruldu. Bu jelin donması beklenirken üzerine ince bir n-bütanol tabakası dökülerek jelin pürüzsüz olması sağlandı (dökme işlemi yana eğilerek yapılır). Bir saat

ayırma jelinin donması beklenip ayırma jelinin katılaştığı belirlendikten sonra yığma jeli hazırlandı. Hazırlanan yığma jeli, ayırma jelinin üst kısmındaki boşluğa dolduruldu ve numune kuyucuklarını oluşturmak için tarak jelin içine dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Tarak uçlarında hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edildi (hava kabarcığı oluşur ise oksijen, polimerizasyonu inhibe edecek ve kuyucukların alt tarafındaki jel yüzeyinde bozukluğa neden olacaktır). Yığma jelinin katılaşması beklenirken ısıtılmış süzgeç kâğıdı sistemin üzerine kapatıldı ve jelin üst kısmının çok kurumaması engellendi. Yığma jelinin katılaştığı belirlendikten sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkarılarak numune kuyuları belirlendi. Her bir kuyucuk saf su ile yıkandı, daha sonra kuyucuklar yürütme tamponu ile dolduruldu ve jel plakalarla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu dolduruldu. Enzim örneklerine numune tamponu eklendikten sonra üzerine takip boyası olarak % 0.1 bromtimol mavisi damlatıldı. Toplam hacim 200 µL olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu eklendi ve bu karışım 65 °C’de su banyosunda 90 saniye bekletildi. Herbir kuyucuğa 20, 30, 40 ve 50 µL enzim örneği ve markır (Fermentas SM0671) ilave edildi. Numuneler ince bir enjektör ile jeldeki kuyulara enjekte edildi. Elektroforez tankı kapatılarak alt tarafından (+) anot, üst taraftan ise (-) katot yerleştirildi. Önce 60 voltta 20 dakika yürütüldü ve örnekler ayırma jeline kadar gelerekburada birikti. Sonra akım 80 volt’a çıkartılarak numunelerin jelin alt sınırına gelmesine kadar yürütme işlemine devam edildi. Numune tamponuna katılan brom timol mavisi ile numune bantları takip edildi ve takip boyası aşağıya ulaştığında akım kesildi. Yürütme işlemi bittikten sonra akım kesilerek plakalar arasındaki jel dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve jel boyama çözeltisine bırakıldı ve çalkalayıcı üzerinde 2 saat bekletilerek boyanması sağlandı. Jel boyandıktan sonra çözeltiden çıkarılarak I. yıkama çözeltisine bırakıldı. Daha sonra bantların daha iyi belirginleşmesi için jel II. yıkama çözeltisine bırakıldı. Jelin rengi açılıp, protein bantları belirginleşene kadar çalkalayıcı üzerinde yıkanan jel çıkarılarak fotoğrafı çekildi (Şekil 4.3).

Ayırma jeli: 5 mL 1.5M Tris-HCl (pH= 8.8), 6.6 mL % 30 akrilamid- % 2.7 bisakrilamid, 0.2 mL % 10’luk SDS, 6.6 µL TEMED, 100 µL % 10’luk amonyum persülfat (APS) ve 8 mL bidistile su karıştırıldı.

Yığma jeli: 2.5 mL 0.5 M Tris-HCl (pH= 6.8), 1.33 mL % 30 akrilamid % 2.7 bisakrilamid, 0.1 mL % 10’luk SDS, 5 µL TEMED, 50 µL % 10’luk APS ve 6.1 mL

bidistile su karıştırıldı. APS çözeltisi taze hazırlandı ve jel çözeltisi karıştırılırken hemen APS eklendi.

Çizelge 3.1 SDS-PAGE elektroforezi için ayırma jeli ve yığma jeli konsantrasyonları

	<u>Ayırma Jeli</u>	<u>Yığma Jeli</u>
Tris-HCl (pH= 8.8)	5 mL	-
Tris-HCl (pH= 6.8)	-	2.5 mL
% 30 akrilamid-% 2.7 bisakrilamid	6.6 mL	1.33 mL
% 10'luk SDS	0.2 mL	0.1 mL
TEMED	6.6 µL	5 µL
% 10'luk APS	100 µL	50 µL
Bidistile su	8 mL	6.1 mL

3.2.5 İnsan serumu ACE'nin Alt Birimlerinin SDS-PAGE ile Molekül Ağırlıklarının Belirlenmesi

İnsan serumu ACE enziminin alt birimlerinin molekül ağırlığını belirlemek için sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. SDS proteinleri denatüre ederek alt birimlerine ayırır. Elektroforez resminde gözlenen bant toplam molekülkütle değil, alt birimlerinin molekül ağırlığıdır. Bu amaçla yapılan elektroforez 3.2.4'te anlatıldığı gibi yapıldı. Enzimin alt birimlerinin molekül ağırlığını belirlemek için standart protein karışımı (protein markırı)'dan da yürütülmesi gereklidir. Bu nedenle molekül ağırlıkları 10 kDa ile 170 kDa aralığında değişen standart proteinlerden oluşan ticari belirteç Fermentas SM0671 kullanıldı. Jel hazırlanıp elektroforez tankına yerleştirildikten sonra kuyulardan birine 5 µL standartları içeren çözelti yüklendi. Diğer kuyulara ise enzim numuneleri tatbik edilerek yürütüldü. Yürütme işlemi bittikten sonra jel boyama ve yıkama işleminden sonra jelin fotoğrafı çekildi. Enzim ve standartların R_f değerleri $R_f = \text{enzimin yürüme mesafesi/boyanın yürüme mesafesi}$ formülünden hesaplanarak $R_f = \log M_A$ standart grafiği oluşturuldu. Bu grafikten ve grafiğin denkleminde yararlanarak R_f değeri hesaplanan insan serumu anjiotensin konverting enzimin molekül ağırlığı hesaplandı (Şekil 4.4) (Laemmli, 1970).

3.2.6 İnsan serumu ACE için V_{max} ve K_M değerlerinin belirlenmesi

İnsan serumundan saflaştırılan ACE enzimini daha fazla karakterize etmek için biyokimyasal parametreleri bulundu. Saflaştırılmış ACE enzimi için 5 farklı FAPGG

konsantrasyonunda ölçümler yapıldı. Daha sonra bu değerler kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten V_{max} ve K_M değerleri hesaplandı.

3.2.7 ACE ile Yapılan Kinetik Çalışmalar

3.2.7.1 İnsan Serum ACE Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

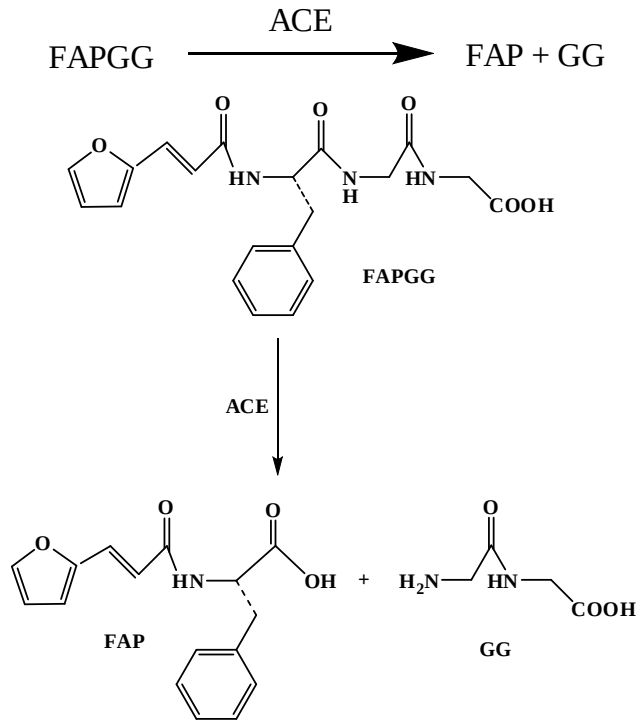
İnsan serumundan saflaştırılan ACE'nin optimum sıcaklığı, sabit sıcaklık sirkülasyon banyosu kullanılarak belirlendi. Aktivite ölçümü için kullanılacak olan HEPES tamponu, ACE ve FAPGG substratı küvet içerisine eklendi, bir vorteks yardımı ile karıştırıldı ve spektrofotometrede ilk absorbans alındı. Daha sonra numune sıcaklığı ayarlanan sabit sıcaklık sirkülasyon banyosuna bırakıldı. Otuz dakika sonunda tekrar sabit sıcaklık sirkülasyon banyosundan çıkarılıp spektrofotometrede son absorbans okundu. 10-60 °C arasında 5'er °C aralıklarla aktivite ölçümleri yapıldı.

3.2.7.2 İnsan Serum ACE Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

İnsan serumundan saflaştırılan ACE'nin optimum pH'sını belirlemek için pH'sı 6.8, 7.0, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8, 8.0, 8.2 olan HEPES tamponları hazırlandı. Bu pH'daki tamponlar kullanılarak tek tek ACE aktiviteleri ölçüldü. Aktivite ölçümü için aynı yöntem uygulandı. Aktivite ölçümü 0.2 birim aralıkta olmak üzere 6.8-8.2 pH değerleri arasında gerçekleştirildi.

3.2.8 ACE Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Aktivite ölçümü için; kontrol (kör) ve numune olmak üzere iki tüp alındı ve tüplerin her birine 100 µL uygun saf enzim eklendi. Daha sonra kontrol tüpüne 900 µL HEPES tamponu eklendi ve karıştırıldı. Spektrofotometre kontrol küveti ile sıfırlandı. Numune tüpüne ise 700 µL 50 mM (pH 7.5) HEPES tamponu ve 200 µL 1 mM'lık substrat (FAPGG) eklendi ve karıştırıldı ve 345 nm'de absorbans ölçüldü. Numune tüpü 30 dakika 35°C'de inkübasyona bırakıldı. 30 dakika sonra tüplerin 345 nm'deki absorbansları tekrar ölçülerek absorbanslarındaki azalış miktarı bulundu.



Şekil 3.1 FAPGG bileşiğinin FAP ve GG bileşiklerine hidrolizi

Yukarıdaki reaksiyonda reaksiyona giren FAPGG 345 nm’de maksimum absorbands vermektedir. Reaksiyon ortamına katılan ACE enzimi FAPGG’nin azalmasına sebep olmaktadır. Bu azalma spektrofotometrik olarak 345 nm’de takip edilmektedir. Bu yöntem Holmquist metodundan modifiye edilmiştir (Holmquist vd., 1979; Andújar Sánchez vd., 2003).

Enzim ünitesi hesaplamalarında Eşitlik 3.1 kullanıldı.

$$A = \frac{\Delta OD}{0.517} \times \frac{V_c}{V_e} \times f \quad (3.1)$$

A: mL başına enzim ünitesi (EU/mL)

ΔOD : Bir dakikadaki absorbands değişimi

V_c : Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi

V_e : Ölçümün yapıldığı küvete eklenen enzim numunesinin hacmi

f: Seyreltme faktörü

0.517 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$: Ekstinksiyon katsayısı

3.2.9 GP, RGDS, SDGRG ve Lisinopril Bileşiklerinin Çözeltilerinin Hazırlanması

Çalışmamızda GP, RGDS, SDGRG ve lisinopril bileşikleri kullanıldı.

GP; 10 miligram GP peptidi tartılarak alındı daha sonra bir miktar saf suda çözüldükten sonra saf suyla hacmi 10 mL'ye tamamlandı.

RGDS; 2 miligram RGDS peptidi tartılarak alındı daha sonra bir miktar saf suda çözüldükten sonra saf suyla hacmi 1 mL'ye tamamlandı.

SDGRG; 1 miligram SDGRG peptidi tartılarak alındı daha sonra bir miktar saf suda çözüldükten sonra saf suyla hacmi 1 mL'ye tamamlandı.

Lisinopril; 1 miligram lisinopril bileşiği tartılarak alındı, bir miktar saf suda çözüldükten sonra saf su ile hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

3.2.10 ACE ile Yapılan Kinetik Çalışmalar

3.2.10.1 İnsan Serum ACE Aktivitesi Üzerine GP, RGDS, SDGRG ve Lisinopril Bileşiklerinin Etkilerinin Belirlenmesi

İnsan serumundan saflaştırılan ACE aktivitesi üzerine GP, RGDS, SDGRG ve lisinopril bileşiklerinin etkisini belirlemek için önce stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltisi ölçümde kullanılarak en uygun konsantrasyon aralığı belirlendi. Konsantrasyon aralığını belirlemek için stok çözelti birçok kez seyreltilerek enzim aktivitesi ölçüldü. ACE enzimi aktivitesi ölçümü normal prosedür uygulanarak yapıldı. Ancak ölçüm küvetine konulacak bileşikler küvetin toplam hacmini (1 mL) aşmayacak şekilde tampon miktarından aynı hacim düşülerek eklendi. Bütün kinetik çalışmalarda bu işlem uygulandı.

İnsan serumundan saflaştırılan ACE aktivitesi üzerine GP, RGDS, SDGRG ve lisinopril bileşiklerinin etkisi belirlendi. Bu bileşiklerden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4-4.6 ile Şekil 4.7-4.9'te gösterildi.

Çizelge 3.2 İnsan serumu ACE enziminin GP, RGDS, SDGRG ve Lisinopril içeren aktivite ölçüm küvet içeriği

	<u>Kontrol Küveti</u>	<u>Numune Küveti</u>
50 mM HepesNa/0.3 M NaCl/10 µM ZnCl ₂	900 µL	700 µL
1 mM FAPGG	-	200 µL
İnsan serumu	100 µL	100 µL
GP, RGDS, SDGRG ve Lisinopril	Değişken	Değişken
35 °C’de 30 dakika inkübasyon		

3.2.11 İnsan Serumu ACE Aktivitesi Üzerine Etkisi İncelenen GP, RGDS, SDGRG ve Lisinopril Bileşiklerinin K_i Değeri, İnhibisyon Türü ve IC₅₀ Değerinin Belirlenmesine Yönelik Çalışmalar

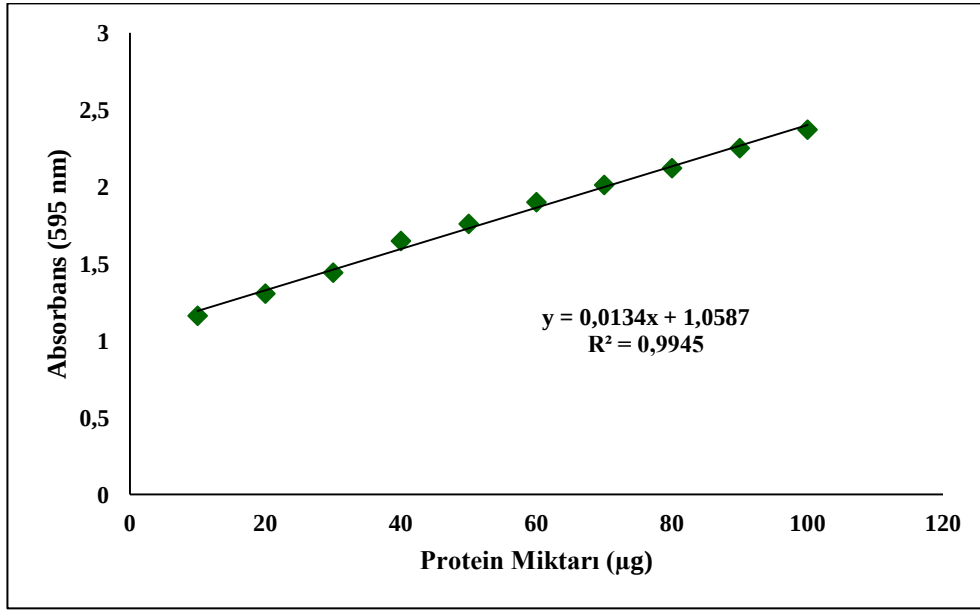
GP, RGDS, SDGRG ve Lisinopril bileşikleri değişik konsantrasyonlarda küvet içeriğine eklenerek ACE aktiviteleri ölçüldü. Bu aktivitelerden % Aktivite – [İnhibitör] değeri ile grafikler çizildi. Elde edilen grafik denklemlerinden IC₅₀ değerleri hesaplandı.

GP, RGDS, SDGRG ve lisinopril bileşiklerinin inhibisyon türünü belirlemek için insan serumundan saflaştırılan ACE aktivitesini yarıya düşüren GP, RGDS, SDGRG ve lisinopril konsantrasyonu ile bu değerin altında ve üstünde 3 sabit GP, RGDS, SDGRG ve lisinopril konsantrasyonlarında uygun 5 substrat konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerle her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Grafiklerden inhibisyon türü belirlendi. Sonuçlar Çizelge 4.8’de verildi.

4. BULGULAR

4.1 Kantitatif Protein Belirlenmesi için Hazırlanan Standart Grafik

Bradford metodu ile kantitatif protein tayini yapıldı. Standart grafik aşağıdaki Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Bradford metodu ile proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan standart grafik

4.2 İnsan Serumu ACE Enziminin Afinite Kromatografisi Yöntemi ile Saflaştırılması Sonuçları

Bu çalışmada insan serumundan saflaştırılan ACE için bulunan değerler Şekil 4.2’de belirtilmiştir.

4.2.1 İnsan Serumu ACE Enzimi için Saflaştırma Sonuçları

İnsan serumu için mL’deki enzim ünitesi 38.69 EU/mL, mL’deki protein miktarı da 119.80 mg protein/mL olarak bulundu.

İnsan serumu için spesifik aktivite Eşitlik 4.1’de belirtildiği gibi bulundu.

$$\frac{\text{EU/mL}}{\text{mg protein/mL}} = \frac{38.69}{119.80} = 0.323 \quad (4.1)$$

Bradford metodu ile insan serumundan saflaştırılan ACE çözeltisinin kantitatif protein tayini yapıldı. ACE için enzim ünitesi EU/mL cinsinden belirlendi. İnsan serumundan saflaştırılan ACE çözeltisi için mL’deki enzim ünitesi 70.92 EU/mL, mL’deki protein miktarı da 0.06142 mg/mL olarak hesaplandı.

Saf serum ACE için spesifik aktivite Eşitlik 4.2’de bulunmuştur.

$$\frac{\text{EU/mL}}{\text{mg protein/mL}} = \frac{70.92}{0.06142} = 1154.67 \quad (4.2)$$

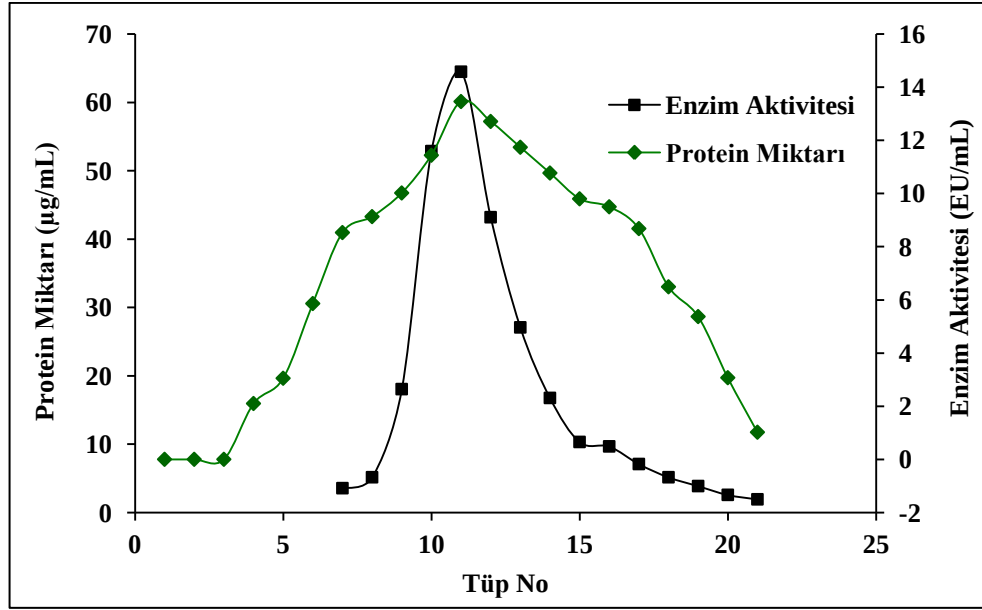
Saflaştırma katsayısı ise;

$$\frac{\text{Spesifik Aktivite 2}}{\text{Spesifik Aktivite 1}} = \frac{1154.67}{0.323} = 3575 \quad (4.3)$$

Eşitlik 4.3’de belirlendi.

Bu sonuca göre ACE enzimi insan serumundan 3575 kat saflaştırıldı.

Aşağıdaki grafikte yaklaşık 9-17 nolu tüplerin yüksek ACE aktivitesi ve yüksek protein miktarı gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.2).



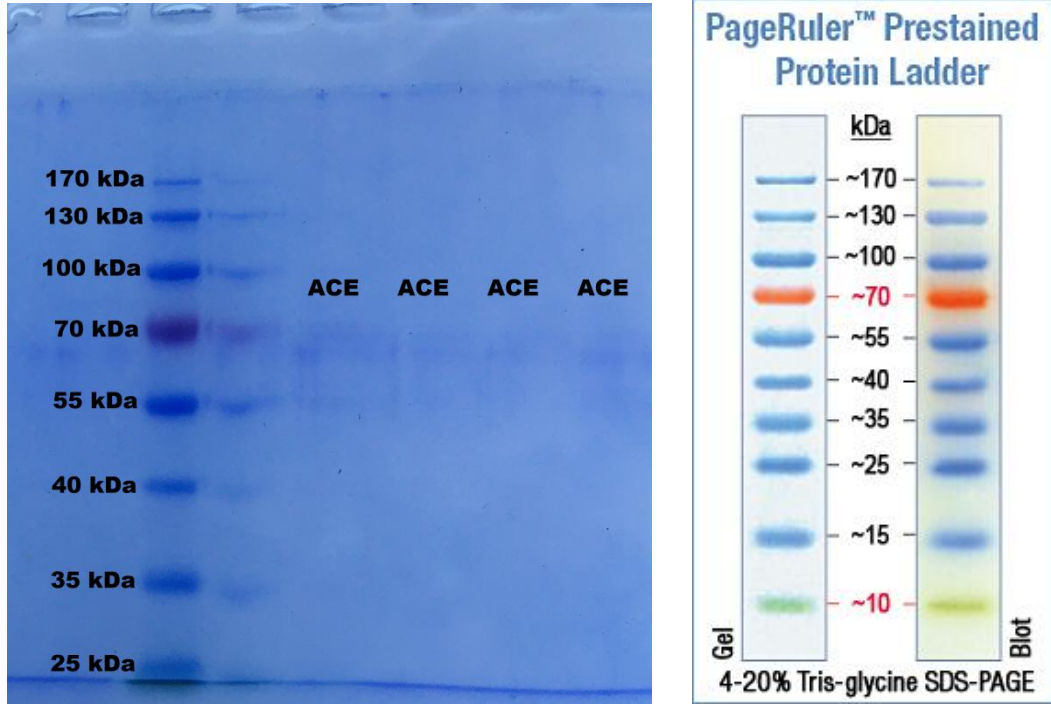
Şekil 4.2 Afinite kolonundan elde edilen insan serumu tüplerinin kalitatif protein tayinleri ve aktivite değerleri

Çizelge 4.1 İnsan serumundaki ACE enziminin saflaştırma adımları

Saflaştırma Adımları	Aktivite (EU/mL)	Toplam Hacim (mL)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (EU)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
İnsan serumu	38.69	16	119.80	1916.8	619.04	0.323	100	1.0
NHS-Activated Sepharose 4 Fast Flow Kromatografisi	70.92	9	0.06142	0.55278	638.28	1154.67	56.25	3575

4.3 İnsan Serumu ACE enziminin SDS-PAGE yöntemi ile Saflığının Kontrolü

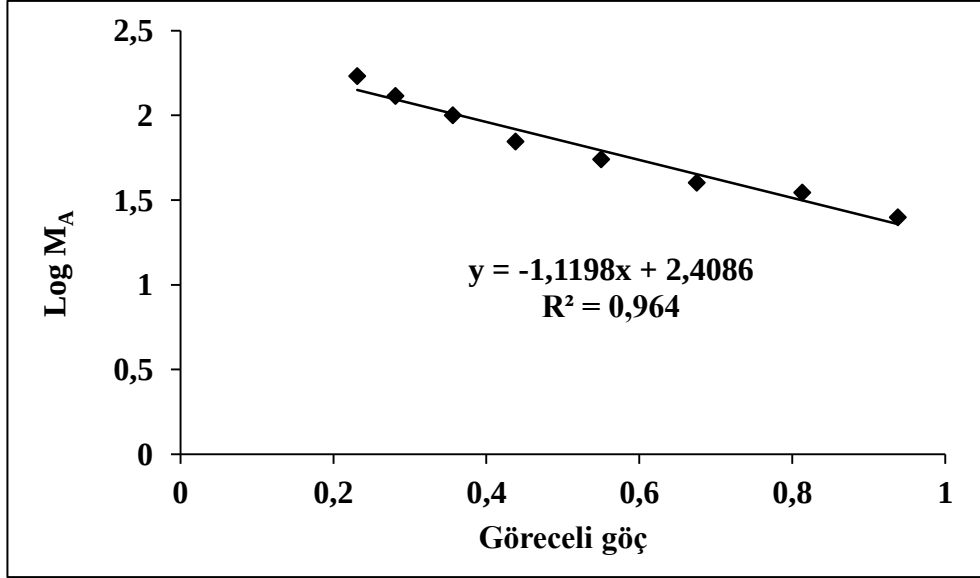
SDS-PAGE metodu ile insan serumundan saflaştırılan ACE'nin molekül ağırlığı ve saflığı tespit edildi. Elektroforez jeli Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3 İnsan serumundan saflaştırılan anjiotensin konverting enzimin SDS-PAGE fotoğrafı ve standart markırın orijinal göstergesi

4.4 İnsan Serumundaki Anjiotensin Konverting Enzimin Alt Birimlerinin SDS-PAGE Yöntemi ile Molekül Ağırlığının Bulunmasına Ait Sonuçlar

İnsan serumu ACE'in alt birimlerinin molekül ağırlıklarının için yürütülen standart proteinlerin ve saf ACE'nin R_f değerleri bulunarak R_f (Göreceli Göç) – $\log M_A$ standart grafik hazırlandı. İnsan serumundan saflaştırılan ACE'nin alt birimlerinin molekül ağırlığı 60 ve 70 kDa olarak belirlendi.



Şekil 4.4 İnsan serumu ACE enziminin SDS-PAGE ile altbirimlerinin molekül ağırlıklarının bulunmasında kullanılan standart grafik

4.5 İnsan serumu ACE için $V_{\max}$ ve K_M Değerlerinin Belirlenmesi Sonuçları

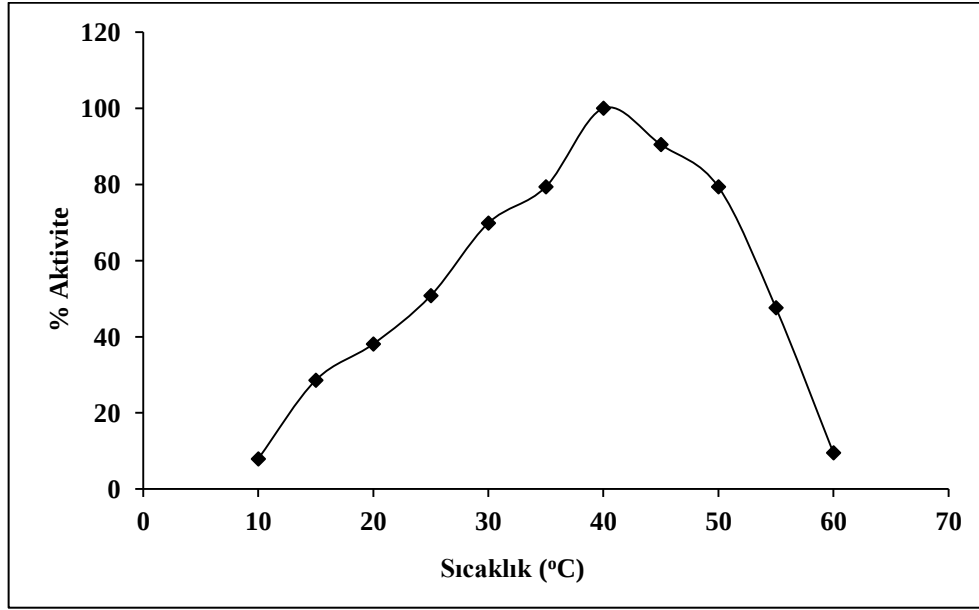
Lineweaver-Burk grafiği ile K_M ve $V_{\max}$ değerleri sırasıyla 0.2 mM ve 96.15 ($\mu\text{mol/dk} \cdot \text{mL}^{-1}$) olarak hesaplandı.

4.6 İnsan Serumu ACE Enzimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi Sonuçları

İnsan serumundan saflaştırılan ACE'nin optimum sıcaklığını belirlemek için HEPES tamponu ile 10 °C ile 60 °C arasında aktivite ölçümleri yapıldı. Bulunan değerler Çizelge 4.2 ve Şekil 4.5'te belirtildi.

Çizelge 4.2 İnsan serumu ACE enziminin sıcaklık, aktivite ve % aktivite değerleri

(°C)	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
EU	3.22	11.61	15.47	20.63	28.37	32.24	40.62	36.75	32.24	19.34	3.87
%Akt.	7.93	28.58	38.09	50.79	69.84	79.37	100	90.47	79.37	47.61	9.53



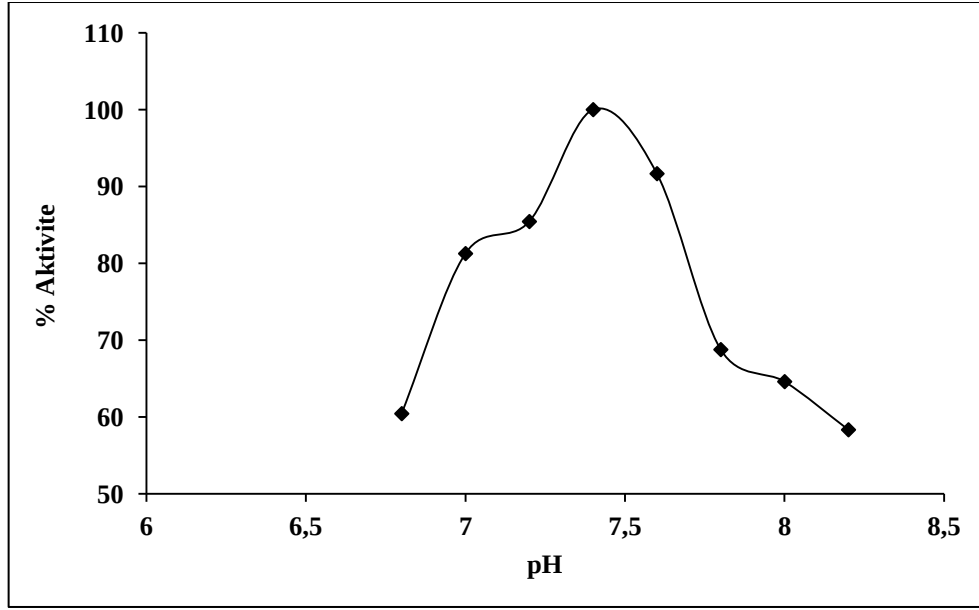
Şekil 4.5 İnsan serumu ACE enziminin sıcaklık-% aktivite grafiği

4.7 İnsan Serumu ACE Enzimi Üzerine pH'nın Etkisi Sonuçları

İnsan serumundan saflaştırılan ACE enziminin optimum pH'sını belirlemek için HEPES tamponunun pH'sı 0.2 birim değiştirilerek 6.8-8.2 değerleri arasında ölçümler yapıldı. Bulunan değerler Çizelge 4.3 ve Şekil 4.6'de belirtildi.

Çizelge 4.3 İnsan serumu ACE enziminin pH, aktivite ve % aktivite değerleri

pH	6.8	7.0	7.2	7.4	7.6	7.8	8.0	8.2
EU	18.70	25.15	26.44	30.95	28.37	21.28	19.99	18.05
%Akt.	60.42	81.26	85.43	100	91.66	68.76	64.59	58.32



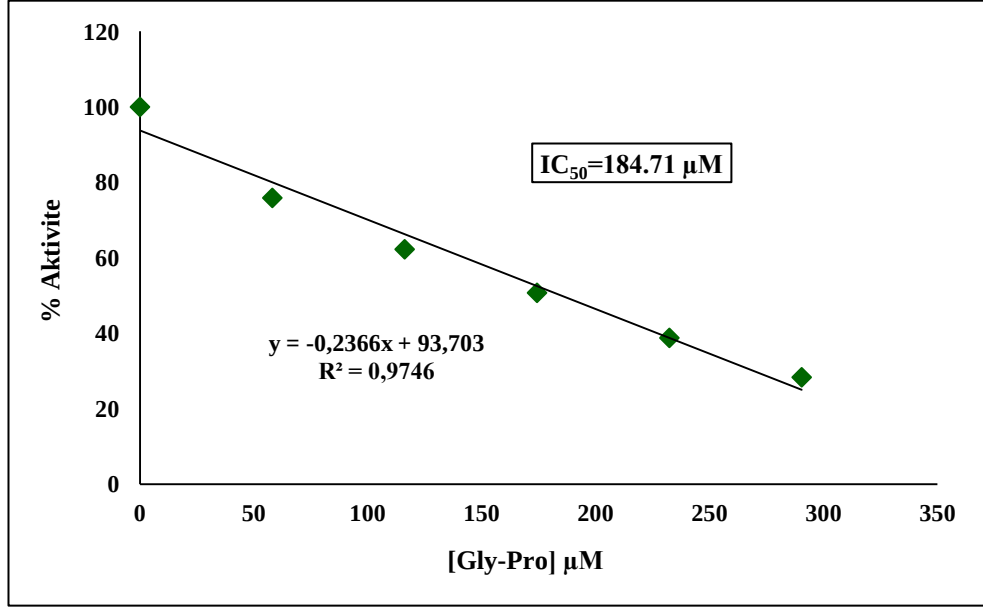
Şekil 4.6. İnsan serumu ACE enziminin pH - % aktivite grafiği

4.8 İnsan serumu ACE Enzimi Üzerine GP, RGDS, SDGRG ve Lisinopril Bileşiklerinin Etkilerinin Bulunmasına Ait Çalışma Sonuçları

Saf ACE üzerine GP, RGDS, SDGRG ve lisinopril bileşiklerinin etkilerini belirlemek için aktivite ölçümleri yapıldı. Bu değerler Çizelge 4.4-4.7 ile Şekil 4.7-4.10'te belirtildi.

Çizelge 4.4 İnsan serumundaki ACE enziminin GP konsantrasyonu ile değişen aktivite ve % aktivite değerleri

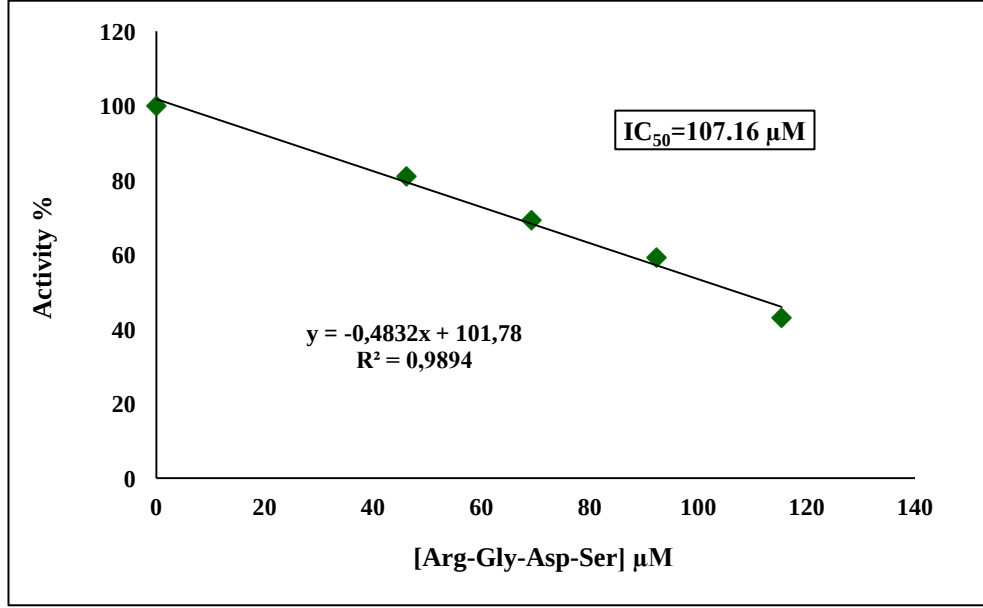
I (μM)	0	58.08	116.16	174.24	232.32
EU	43.20	32.79	26.91	21.92	16.76
%Akt.	100	75.89	62.28	50.74	38.8



Şekil 4.7 İnsan serumundaki ACE enzimi üzerine GP peptidinin etkisi

Çizelge 4.5 İnsan serumundaki ACE enziminin RGDS konsantrasyonu ile değişen aktivite ve % aktivite değerleri

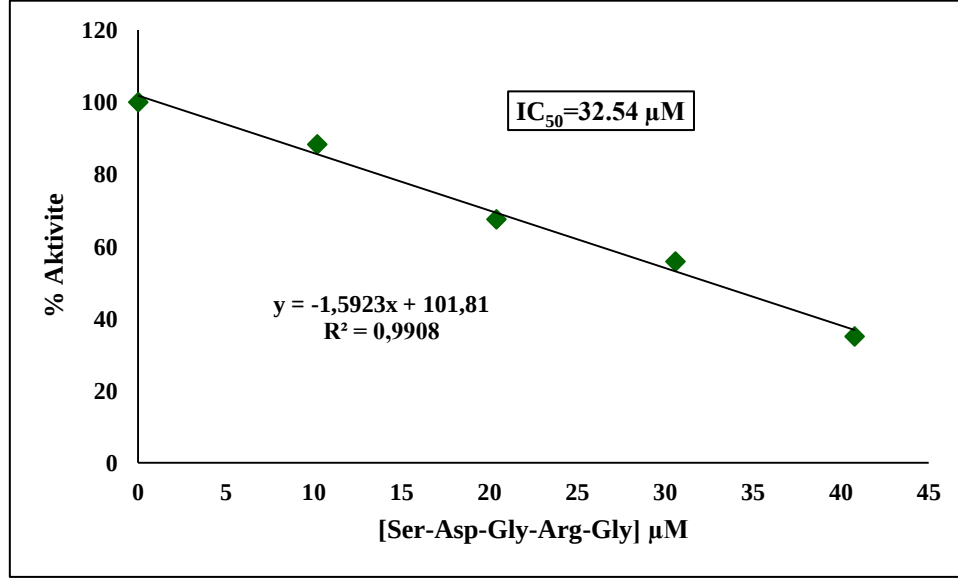
I (μM)	0	46.15	69.22	92.29	115.36
EU	39.33	31.90	27.26	23.32	16.96
%Akt.	100	81.10	69.32	59.29	43.12



Şekil 4.8 İnsan serumundaki ACE enzimi üzerine RGDS peptidinin etkisi

Çizelge 4.6 İnsan serumundaki ACE enziminin SDGRG konsantrasyonu ile değişen aktivite ve % aktivite değerleri

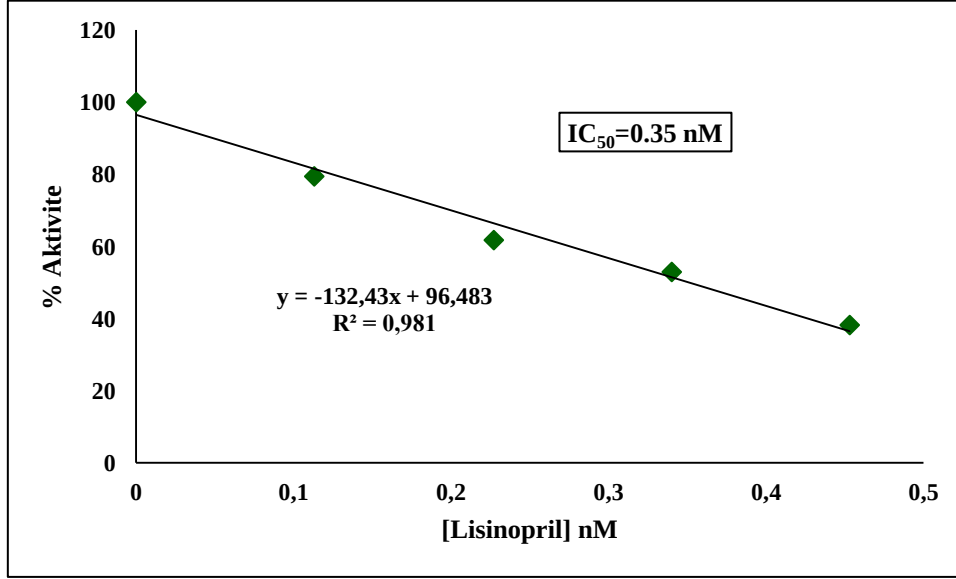
I (μM)	0	10.19	20.39	30.58	40.78
EU	49.65	43.84	33.53	27.72	17.41
%Akt.	100	88.3	67.53	55.83	35.07



Şekil 4.9 İnsan serumundaki ACE enzimi üzerine SDGRG peptidinin etkisi

Çizelge 4.7 İnsan serumundaki ACE enziminin lisinopril konsantrasyonu ile değişen aktivite ve % aktivite değerleri

I (μM)	0	0.113	0.227	0.34	0.453
EU	43.84	34.82	27.08	23.21	16.76
%Akt.	100	79.43	61.77	52.94	38.23



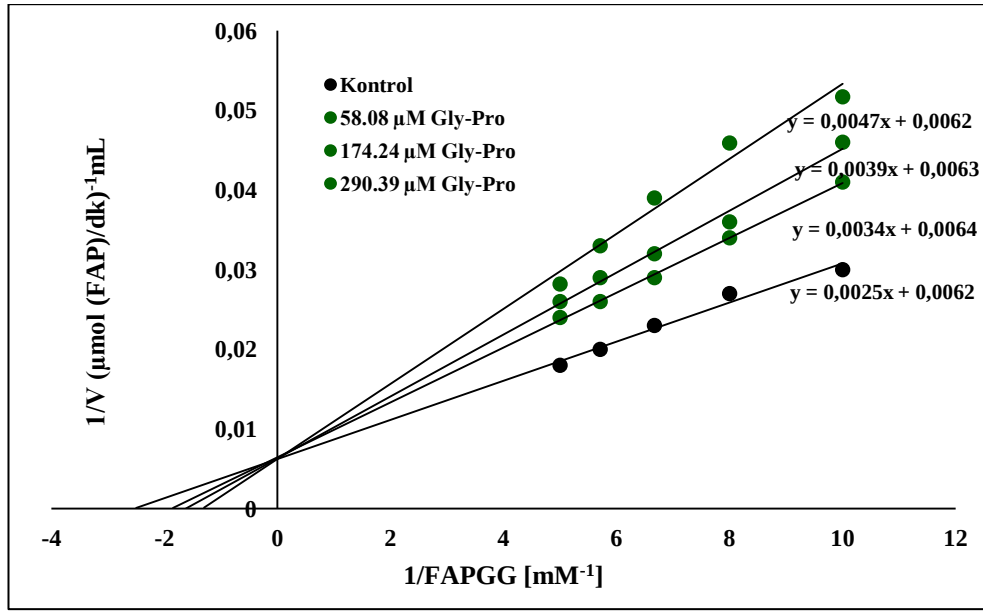
Şekil 4.10 İnsan serumundaki ACE enzimi üzerine lisinopril bileşiğinin etkisi

Çizelge 4.8 İnsan serumu ACE için bulunan IC₅₀ ve K_i değerleri ve inhibisyon tipi

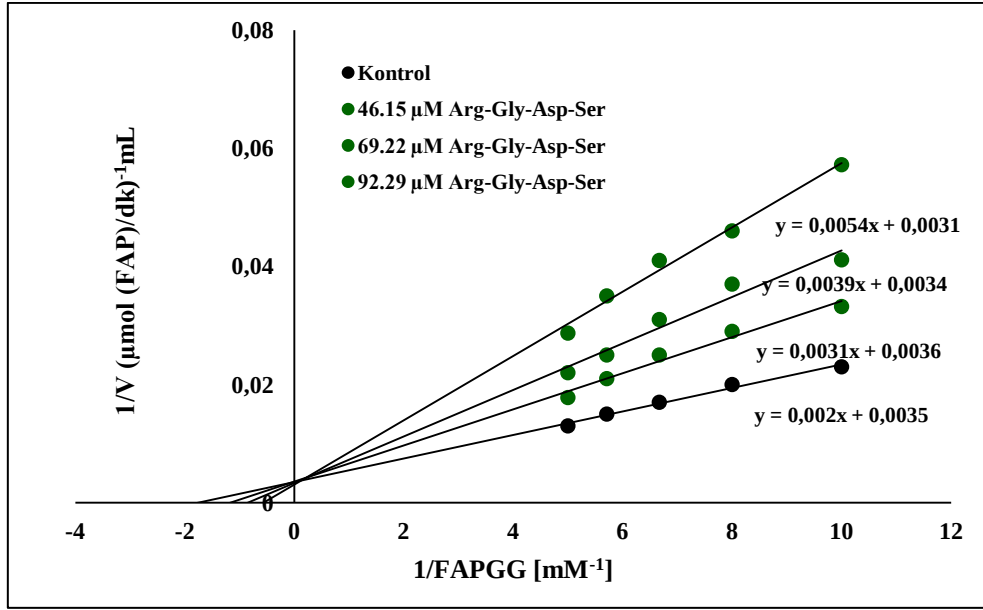
İnhibitör	IC₅₀	K_i	İnhibisyon Türü
GP	184.71 μM	260.02 μM	Yarışmalı
RGDS	107.16 μM	63.44 μM	Yarışmalı
SDGRG	32.54 μM	11.42 μM	Yarışmalı
Lisinopril	0.35 nM	0.15 nM	Yarışmasız

4.9 İnsan Serumu ACE Enzimi Üzerine İnhibitör Etkisi Gösteren GP, RGDS, SDGRG ve Lisinopril Bileşiklerinin İnhibisyon Tipinin Bulunmasına Ait Çalışma Sonuçları

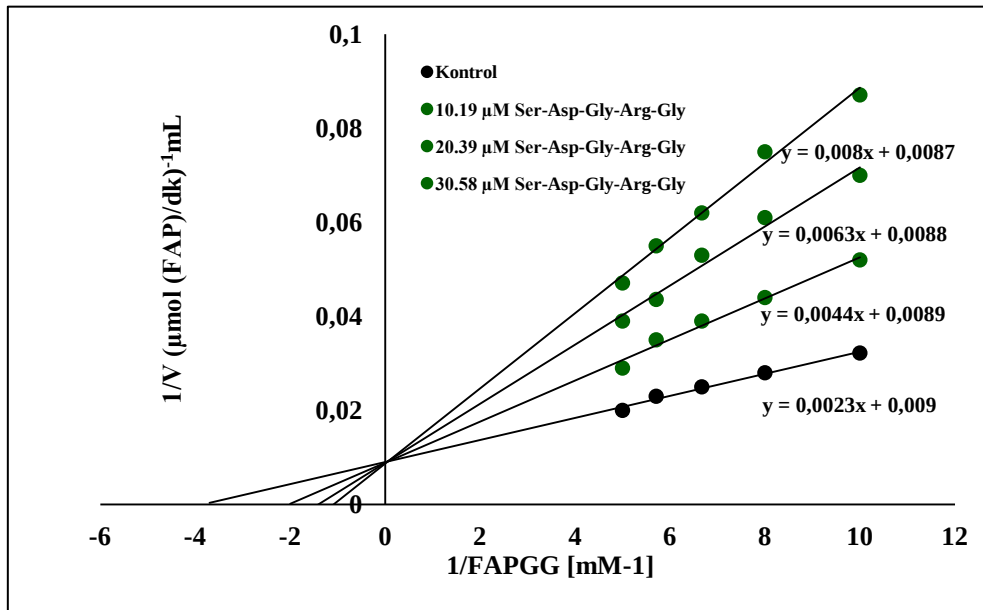
İnsan serumundan saflaştırılan ACE üzerine inhibitör etkisi gösteren GP, RGDS, SDGRG ve lisinopril bileşiklerinin inhibisyon tipini bulmak için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. GP, RGDS ve SDGRG için inhibisyon tipi yarışmalı inhibisyon ve lisinopril için inhibisyon tipi yarışmasız inhibisyon olarak bulundu.



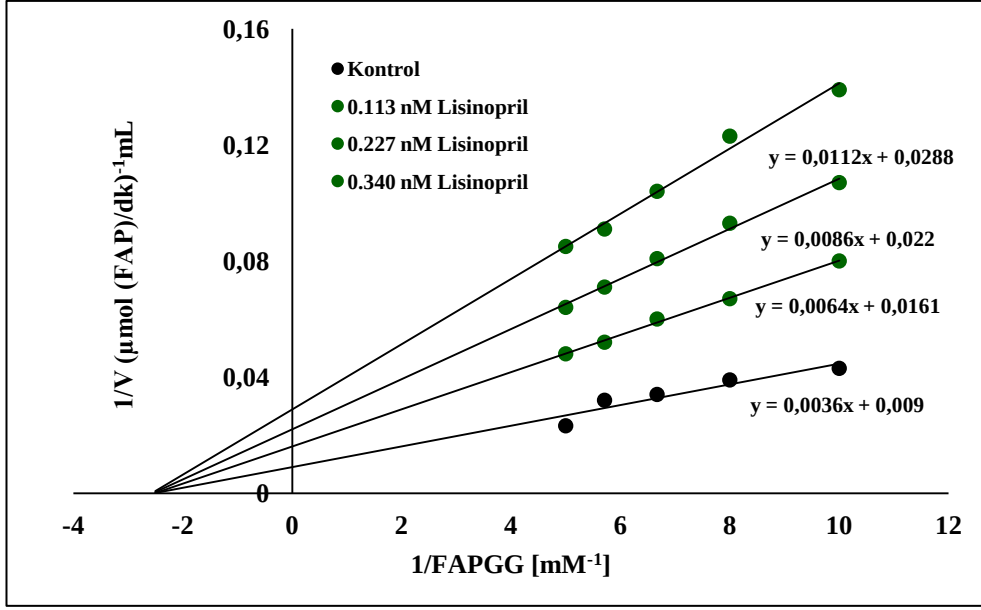
Şekil 4.11 İnsan serumu ACE enzimi üzerine GP peptidinin Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.12 İnsan serumu ACE enzimi üzerine RGDS peptidinin Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.13 İnsan serumu ACE enzimi üzerine SDGRG peptidinin Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.14 İnsan serumu ACE enzimi üzerine lisinopril bileşiğinin Lineweaver-Burk grafiği

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hipertansiyon oldukça yaygın bir kronik hastalıktır ve kardiyovasküler ve böbrek hastalıkları için önemli bir risk faktörüdür (McGrane vd., 2011). Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre, dünya çapında hipertansiyonu olan yaklaşık 1.4 milyar yetişkin var, ancak hastaların durumlarının yalnızca yaklaşık % 14'ü etkili bir şekilde kontrol ediliyor. Dünya çapında hipertansiyon, yaşam ve sağlık için önde gelen bir tehdittir. ACE, anjiotensin I'i anjiotensin II'ye dönüştürerek renin-anjiotensin sisteminde kan basıncının düzenlenmesinde öncü bir fizyolojik rol oynar. Anjiotensin II'nin aşırı üretimi hipertansiyona yol açtığından, ACE inhibitörleri hipertansiyon, kalp yetmezliği ve böbrek yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıkları tedavi etmek için yaygın olarak uygulanmaktadır. Bununla birlikte, bu sentetik inhibitörlerin birçok yan etkinliği vardır (Cheung vd., 2009, Gu ve Wu, 2013). Aynı zamanda son yıllarda yapılan çalışmalarda doğal bileşenler olan biyoaktif peptidlerin ACE üzerindeki inhibitör etkisi araştırılmış ve çok etkileyici sonuçlar gözlenmiştir. Bu nedenle bu çalışmada ACE insan serumundan saflaştırılmış ve Gly-Pro (GP), Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) ve Ser-Asp-Gly-Arg-Gly (SDGRG) biyoaktif peptidlerinin saf ACE üzerindeki etkisi analiz edilmiştir.

Çalışmamızda insan serumundan ACE saflaştırıldı ve bu enzim karakterize edildi. Afinite kromatografisi ile tek adımda 3575 kat saflaştırıldı ve spesifik aktivitesi 1155 EU/mg protein olarak bulundu. Lisinopril ligand olarak kullanıldı ve kolon dolgu maddesi olarak NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow uygulandı. Saflaştırılmış ACE üzerinde GP, RGDS ve SDGRG biyoaktif peptidlerin inhibisyon etkisi incelendi.

Burada insan serumundan saflaştırılan ACE'nin molekül ağırlığı ve saflığı SDS-PAGE yöntemi ile tanımlanmıştır. Elektroforez jelinin üzerinde 60 kDa ve 70 kDa olmak üzere iki bandın oluştuğu gözlemlendi. Aynı zamanda başka çalışmalarda insan plazması ve koyun böbreğinden saflaştırılan ACE'nin molekül ağırlığı benzer şekilde 60 ve 70 kDa olarak bulunmuştur (Basi ve Turkoglu, 2019; Kiylik vd., 2022). Çalışmamızda insan serumundan saflaştırılan ACE'nin iki alt birimden oluşan dimer bir enzim olduğu saptanmıştır.

Bu çalışmada, insan serumundan saflaştırılmış optimum pH aralığı ve en yüksek ACE aktivitesine sahip optimum sıcaklık belirlenmiştir. İnsan serumundan saflaştırılan ACE için optimum sıcaklık 40 °C ve optimum pH aralığı 7.4 olarak belirlendi. Diğer çalışmalarda saf olarak insan plazmasında ve koyun akciğerinde bulunan ACE enzimi

için optimum pH 7.4 ve sıcaklık 35-40 °C olarak bulunmuştur (Basi ve Turkoglu, 2018; Aydin vd., 2021).

İnsan serumundan elde edilen ACE'yi karakterize etmek için biyokimyasal özellikler bulunmuştur. ACE için 5 farklı FAPGG değerinde değerlendirmeler yapıldı. Daha sonra bu değerlere sahip Lineweaver-Burk grafiği çizildi. Bu grafikten K_M ve V_{max} sabitleri sırasıyla 0.2 mM ve 96.15 ($\mu\text{mol/dk}$).mL⁻¹ olarak tespit edildi.

Hipertansiyon kalp ve damar hastalıklarına neden olarak insan sağlığı için çok ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Son zamanlarda, hipertansiyona bağlı komplikasyonların oluşumunu azaltmak için ilaç tedavisi yaygın olarak tercih edilmektedir. Kan basıncının düzenlenmesinde rol oynayan anjiotensin dönüştürücü enzim, en önemli antihipertansif ajanlardan biridir. Hipertansif hastalarda ACE aktivitesinin artması yüksek tansiyonun nedenlerinden biridir. Bu nedenle, hipertansiyon tedavisinde kaptopril, ramipril ve lisinopril gibi ACE inhibitörleri kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu sentetik inhibitörlerin ağız kuruluğu, baş ağrısı, baş dönmesi, çarpıntı ve böbrek yetmezliği gibi yan etkileri kullanımlarını sınırlar (Hermida vd., 2011). Bu yüzden herhangi bir yan etkisi olmayan doğal ve güçlü ACE inhibitörleri tercih edilmektedir. Özellikle, doğal kaynaklardan elde edilen ACE inhibe edici biyoaktif peptidler daha sağlıklı ve daha güvenli terapötik alternatifler olarak ortaya çıkmıştır (Li vd., 2019; Akbarian vd., 2022). Örneğin; bir çalışmada, mısır glütenu unundan elde edilen CS ve DLLGCS peptidleri, sırasıyla 8.5 μM ve 39.0 μM IC_{50} değerleri ile unkompetitif inhibisyon etkisi göstermiştir. K_i değerleri sırasıyla 12.52 ve 11.40 μM olarak tespit edilmiştir (Wongngam vd., 2023). Başka bir çalışmada, tavşan eti proteinlerinden iki yeni ACE inhibitör peptidi (CDF ve EACF) belirlenmiştir. CDF ve EACF peptidlerinin IC_{50} değerleri sırasıyla $192.17 \pm 2.46 \mu\text{M}$ ve $41.06 \pm 0.82 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır. Bu peptidlerin inhibitör türü, sırasıyla kompetitif ve nonkompetitif olarak tanımlanmıştır (Chen vd., 2022).

Biyoaktif peptidler (BP), insan sağlığını etkileyebilen ve vücut fonksiyonlarını olumlu yönde değiştiren spesifik protein bileşenleridir. Biyoaktif peptidler, canlı organizmaların metabolik reaksiyonlarında yer aldıkları için insan sağlığında önemli bir rol oynamaktadır (Kitts ve Weiler, 2003; Sánchez ve Vázquez, 2017). Bu bileşiklerin antioksidan, antimikrobiyal, antitrombotik, antihipertansif, opioid ve immünomodülatör özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Son zamanlarda biyoaktif peptidler üzerine

yapılan araştırmalar sonucunda bu bileşiklerin birçok hastalığın lenmesinde ve tedavisinde etkili olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle, son birkaç yılda biyoaktif peptidlerin üretimine ve özelliklerine olan ilgi önemli ölçüde artmıştır (Rezzani vd., 2010; Lin vd., 2017; Snchez ve Vzquez, 2017). Doğal kaynaklardan elde edilen birçok biyoaktif peptidin ACE zerindeki inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Hurma ekirdeği keki proteinlerinin hidrolizatından üç yeni peptid YGIKVGYAIP, GGIF ve GIFE elde edilmiştir. ACE aktivitesi üzerine inhibitör etkisi gösteren üç biyoaktif peptidin YGIKVGYAIP, GGIF ve GIFE için IC_{50} değerleri sırasıyla 1.0 μM , 92 μM ve 3.0 μM olarak hesaplanmıştır. Ayrıca peptidlerin ACE'ye karşı inhibisyon kinetikleri araştırılmıştır ve K_i değerleri sırasıyla 0.054 mM, 1.27 mM ve 18 mM olarak bulunmuştur (Zarei vd., 2022). Yapılan başka bir çalışmada, *Spirulina platensis* protein hidrolizatlarından iki yeni ACE inhibitör peptidi Val–Thr–Tyr (VTY) ve Leu–Gly–Val–Pro (LGVP) tanımlanmıştır ve bunların IC_{50} değerleri sırasıyla 23.39 μM ve 45.76 μM olarak elde edildi (Zhang vd., 2022). Biyoaktif peptidler, doğal oldukları için antihipertansif sentetik ilaçlara göre daha etkili bir alternatiftir.

Bizim alışmamızda GP, RGDS ve SDGRG biyoaktif peptidlerinin saf ACE zerindeki inhibitör etkisi incelenmiştir. GP, RGDS ve SDGRG peptidleri, sırasıyla 184.71 μM , 107.16 μM ve 32.54 μM IC_{50} değerleri ile önemli bir inhibe edici etki gösterdi. Lisinopril inhibitörünün IC_{50} değeri ise 0.35 nM olarak hesaplandı. Bu biyoaktif peptidlerin K_i değerleri ve inhibitör türleri, Lineweaver-Burk grafiklerinden tanımlandı. GP, RGDS ve SDGRG biyoaktif peptidleri için inhibitör türü, dönüşümlü-yarışmalı (kompetitif) inhibitör olarak tanımlandı. GP, RGDS ve SDGRG biyoaktif peptidler için K_i değerleri sırasıyla 260.02 μM , 63.44 μM ve 11.42 μM olarak hesaplanmıştır. ACE enziminin doğal substratı olan anjiotensin I bir dekapeptid olduğundan, bu çalışmada kullandığımız peptidler beklendiği gibi kompetitif bir inhibisyon etkisi gösterdi. Lineweaver-Burk grafiğinden lisinoprilin inhibisyon türü dönüşümlü-yarışmasız (non-kompetitif) inhibisyon ve K_i değeri 0.15 nM olarak hesaplandı.

Biyoaktif peptidler, hipertansiyonun tedavisinde de büyük öneme sahiptir. Birçok klinik ve deneysel çalışmada, biyoaktif peptidlerin hem insan hem de hayvan modellerinde güçlü in vivo antihipertansif etki gösterdiği belirlenmiştir (Majumder ve Wu, 2014). Örneğin, bir klinik çalışmada, hafif hipertansif insan deneklerde süt

kazeinden türetilen Valin-Prolin-Prolin ve İzolösin-Prolin-Prolin tripeptidlerinin küçük dozlarının (2.0–10.2 mg/gün) diastolik kan basıncını (DKB) -1.9 mmHg ve sistolik kan basıncını (SKB) -4.0 mmHg azalttığı gözlemlenmiştir (Turpeinen vd., 2013). Başka bir çalışmada kazein fraksiyonlarından izole edilen IAK, YAKPVA, LVYPFTGIPN, HLPLP ve WQVLPNAVPAK peptidlerinin oral antihipertansif etkisi spontan hipertansif sıçanlarda (SHR) belirlendi. Uygulama öncesi ve uygulamadan 2, 4, 6, 8 ve 24 saat sonra sıçanların DKB ve SKB'leri tail-cuff (kuyruk-manşet) işlemi kullanılarak değerlendirildi. Bu peptidler, SHR'de DKB ve SKB'yi önemli ölçüde düşürmüştür (Miguel vd., 2010).

Biyoaktif peptidler, insan sağlığı ve vücut fonksiyonları üzerinde olumlu etkisi olan spesifik protein bileşenleridir. BP, antihipertansif, antitrombotik, immünomodülatör ve antioksidatif etkilerle ilaç benzeri aktiviteler gösterir (Girgih vd., 2014; Garzón vd., 2022). Örneğin, Gly-Pro, ampirik beyin iskemisinden sonra ratların neokorteksindeki nöroaktif amino asitlerin metabolizması ve enerji dönüşüm indeksleri üzerindeki anti-iskemik etkinlikleri gösterdiği belirlenen bir kimyasaldır (Bashun vd., 2013). Domuz derisi kollajen hidrolizatından elde edilen Gly-Phe-Hyp-Gly-Pro ve Gly-Pro, sırasıyla 91 µM ve 360 µM IC₅₀ değerleri ile ACE üzerinde bir *in vitro* inhibitör etkinlik göstermiştir. Bu peptidlerin kendiliğinden hipertansif farelere oral olarak uygulanması da kan basıncını önemli ölçüde azaltmıştır (Ichimura vd., 2009). Bir çalışmada, α_vintegrins için yüksek özgülüğe sahip RGDS peptidinin, lipopolisakarit kaynaklı akut akciğer hasarının ilerlemesi sırasında inflamatuvar kaskadı azalttığı gözlemlenmiştir (Moon vd., 2009). Başka bir çalışmada, osteoblast benzeri MC3T3-E1 hücrelerinin RGDS'ye bağlanmasının, mitokondriyal yol ile apoptozu ortadan kaldırdığı gösterilmiştir (Grigoriou vd., 2005). Bu çalışmalar GP ve RGDS peptidlerinin antihipertansif etkilerinin yanı sıra birçok hastalığın tedavisinde de etkili olabileceğini göstermektedir. Ayrıca çalışmamızda kullanılan biyoaktif peptidlerin ACE üzerinde belirgin bir inhibitör etki göstermesi ile hipertansiyonun önlenmesinde etkili olabileceği gözlenmiştir.

Hipertansiyon beyin, kalp ve böbreklerle ilgili hastalıklara yakalanma riskini artıran ciddi bir hastalıktır. Bu hastalık genellikle sentetik ilaçlarla tedavi edilse de bu ilaçlar birçok yan etkiye neden olur. Ancak, doğal inhibitörler hipertansiyonu düzenleyerek önemli yan etkiler olmaksızın tedavi sağlar. Son yıllarda ACE üzerinde

önemli bir inhibitör etkinliğe sahip olan biyoaktif peptidlerin yüksek biyolojik aktiviteleri, düşük toksisiteleri ve insan vücudunda kolay metabolize olmaları nedeniyle sentetik hipertansiyon ilaçlarına çok önemli bir alternatif olduğu görülmektedir. Burada ACE, tek adımda insan serumundan başarıyla saflaştırıldı. Gly-Pro (GP), Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) ve Ser-Asp-Gly-Arg-Gly (SDGRG) biyoaktif peptidlerin saflaştırılmış ACE üzerindeki inhibisyon etkisi araştırıldı ve önemli ölçüde bir inhibitör etkisi bulundu. Biyoaktif peptidlerin ACE'ye karşı inhibisyon kinetikleri araştırıldı. Aynı zamanda, bu peptidlerin inhibisyon grafiğinden IC_{50} değerleri hesaplandı. Biyoaktif peptidlerin çok düşük IC_{50} değerleri ile büyük ölçüde inhibitör etkisi gösterdiği bulundu. Sonuç olarak, GP, RGDS ve SDGRG biyoaktif peptidlerin hipertansiyon tedavisinde uygulanan sentetik ACE inhibitörleri yerine kullanılabilecek doğal alternatifler olabileceği belirlendi. Doğal biyoaktif özelliklerinden dolayı peptidler, ilaç endüstrisi tarafından yararlanılabilecek umut verici bir yaklaşımdır. Özellikle ACE üzerinde inhibitör etkisi olan biyoaktif peptidler daha güvenli bir alternatiftir ve gelecekteki ilaç tasarımı için kullanılabileceği düşünülen çok önemli bileşiklerdir. Aynı zamanda, aktif farmasötik bileşenler olarak yaygın kullanımlarından önce bu biyoaktif peptidlerin etkisini göstermek için ayrıntılı insan çalışmaları gerekmektedir.



KAYNAKLAR

- Acharya, K. R., Sturrock, E. D., Riordan, J. F., Ehlers, M. R. (2003). Ace revisited: a new target for structure-based drug design. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(11), 891-902.
- Akbarian, M., Khani, A., Eghbalpour, S., Uversky, V. N. (2022). Bioactive peptides: Synthesis, sources, applications, and proposed mechanisms of action. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1445.
- Ali, M. Y., Jannat, S., Chang, M. S. (2023). Discovery of potent angiotensin-converting enzyme inhibitors in pomegranate as a treatment for hypertension. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(30), 11476–11490.
- Aluko R. E. (2015). Antihypertensive peptides from food proteins. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6, 235–262.
- Andújar-Sánchez, M., Cámara-Artigas, A., Jara-Pérez, V. (2003). Purification of angiotensin I converting enzyme from pig lung using concanavalin-A sepharose chromatography. *Journal of Chromatography B*, 783, 247-252.
- Arendse, L. B., Danser, A. H. J., Poglitsch, M., Touyz, R. M., Burnett, J. C., Jr, Llorens-Cortes, C., Ehlers, M. R., Sturrock, E. D. (2019). Novel therapeutic approaches targeting the renin-angiotensin system and associated peptides in hypertension and heart failure. *Pharmacological Reviews*, 71(4), 539–570.
- Aydin, F., Turkoglu, V., Bas, Z. (2021). Purification and characterization of angiotensin-converting enzyme (ACE) from sheep lung. *Molecular Biology Reports*, 48(5), 4191–4199.
- Barker, D. J. P., Winter, P. D., Osmond, C., Margetts, B. (1989). Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet*, 2(8663), 577-580.
- Bashun, N. Z., Doroshenko, E. M., Raduta, E. F., Balash, Zh. I., Kanunnikova, N. P., Golubovich V. P., Moiseenok A. G. (2013). The effect of the glycyl-proline dipeptide on the metabolism of neuroactive amino acids and indices of energy turnover in the neocortex of rats after experimental brain ischemia. *Neurochemical Journal*, 7, 39-44.
- Basi, Z., Turkoglu, V. (2018). Purification of angiotensin-converting enzyme from human plasma and investigation of the effect of some active ingredients isolated from *Nigella sativa* L. extract on the enzyme activity. *Biomedical Chromatography: BMC*, 32(5), e4175.
- Basi, Z., Turkoglu, V. (2019). In vitro effect of oxidized and reduced glutathione peptides on angiotensin converting enzyme purified from human plasma. *Journal of chromatography. B, Analytical Technologies in The Biomedical and Life Sciences*, 1104, 190–195.
- Bell, L., Madri, J. A. (1990). Influence of the angiotensin system on endothelial and smooth muscle cell migration. *The American Journal of Pathology*, 137(1), 7–12.
- Borghgi, C., Tsioufis, K., Agabiti-Rosei, E., Burnier, M., Cicero, A. F. G., Clement, D., Coca, A., Desideri, G., Grassi, G., Lovic, D., Lurbe, E., Kahan, T., Kreutz, R., Jelakovic, B., Polonia, J., Redon, J., Van De Borne, P., Mancia, G. (2020). Nutraceuticals and blood pressure control: a European Society of Hypertension position document. *Journal of Hypertension*, 38(5), 799–812.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-54.

- Brand, M., Lamandé, N., Sigmund, C. D., Larger, E., Corvol, P., Gasc, J. M. (2006). Angiotensinogen modulates renal vasculature growth. *Hypertension*, 47(6), 1067-1074.
- Bremner, A. D. (2002). Antihypertensive medication and quality of life—silent treatment of a silent killer?. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 16, 353-364.
- Carlberg, I., Mannervik, B. (1981). Purification and characterization of glutathione reductase from calf liver. An improved procedure for affinity chromatography on 2',5'-ADP-Sepharose-4B. *Analytical Biochemistry*, 116, 531-536.
- Cascieri, M. A., Bull, H. G., Mumford, R. A., Patchett, A. A., Thornberry, N. A., Liang, T. (1984). Carboxyl-terminal tripeptidyl hydrolysis of substance P by purified rabbit lung angiotensin-converting enzyme and the potentiation of substance P activity in vivo by captopril and MK-422. *Molecular Pharmacology*, 25(2), 287-293.
- Chen, J., Yu, X., Chen, Q., Wu, Q., He, Q. (2022). Screening and mechanisms of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from rabbit meat proteins: A combined in silico and in vitro study. *Food Chemistry*, 370, 131070.
- Cheung, I. W., Nakayama, S., Hsu, M. N., Samaranayaka, A. G., Li-Chan, E. C. (2009). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of hydrolysates from oat (*Avena sativa*) proteins by in silico and in vitro analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19), 9234-9242.
- Chockalingam, A., Campbell, N. R., Fodor, J. G. (2006). Worldwide epidemic of hypertension. *The Canadian journal of cardiology*, 22(7), 553-555.
- Cicero, A. F., Grassi, D., Tocci, G., Galletti, F., Borghi, C., Ferri, C. (2019). Nutrients and nutraceuticals for the management of high normal blood pressure: an evidence-based consensus document. *High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention*, 26, 9-25.
- Dahlöf, B. (2010). Cardiovascular disease risk factors: epidemiology and risk assessment. *The American Journal of Cardiology*, 105(1), 3A-9A.
- De Leo, F., Panarese, S., Gallerani, R., Ceci, L. R. (2009). Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides: production and implementation of functional food. *Current Pharmaceutical Design*, 15(31), 3622-3643.
- Fields, K., Falla, T. J., Rodan, K., Bush, L. (2009). Bioactive peptides: signaling the future. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 8(1), 8-13.
- Flack, J. M., Novikov, S. V., Ferrario, C. M. (1996). Benefits of adherence to anti-hypertensive drug therapy. *European Heart Journal*, 17, 16-20.
- Fountain, J. H., Kaur, J., Lappin, S. L. (2023). **Physiology, renin angiotensin system**. In StatPearls. StatPearls Publishing.
- Friedland, J., Silverstein, E., Drooker, M., Setton, C. (1981). Human lung angiotensin converting enzyme. Purification and antibody preparation. *The Journal of Clinical Investigation*, 67(4), 1151-1160.
- Garzón, A. G., Veras, F. F., Brandelli, A., Drago, S. R. (2022). Purification, identification and in silico studies of antioxidant, antidiabetogenic and antibacterial peptides obtained from sorghum spent grain hydrolysate. *LWT*, 153, 112414.
- Girgih, A. T., He, R., Aluko, R. E. (2014). Kinetics and molecular docking studies of the inhibitions of angiotensin converting enzyme and renin activities by hemp seed (*Cannabis sativa* L.) peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(18), 4135-4144.

- Gobbetti, M., Stepaniak, L., De Angelis, M., Corsetti, A., Di Cagno, R. (2002). Latent bioactive peptides in milk proteins: proteolytic activation and significance in dairy processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(3), 223-239.
- Grigoriou, V., Shapiro, I. M., Cavalcanti-Adam, E. A., Composto, R. J., Ducheyne, P., Adams, C. S. (2005). Apoptosis and survival of osteoblast-like cells are regulated by surface attachment. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(3), 1733-1739.
- Gu, Y., Wu, J. (2013). LC-MS/MS coupled with QSAR modeling in characterising of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean proteins. *Food Chemistry*, 141(3), 2682-2690.
- Guo, D. F., Sun, Y. L., Hamet, P., Inagami, T. (2001). The angiotensin II type 1 receptor and receptor-associated proteins. *Cell Research*, 11(3), 165-180.
- Han, X. X., Jia, Y. Q., Liu, C. Y., Wang, H. Y., Zhu, Z. Y. (2023) Structure identification and inhibitory mechanism evaluation of three novel angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from small-aroma chicken. *Process Biochemistry*, 132, 86-96.
- Harrison-Bernard L. M. (2009). The renal renin-angiotensin system. *Advances in Physiology Education*, 33(4), 270-274.
- Herman, L. L., Padala, S. A., Ahmed, I., Bashir, K. (2023). **Angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEI)**. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Hermida, R. C., Ayala, D. E., Fernandez, J. R., Portaluppi, F., Fabbian, F., Smolensky, M. H. (2011). Circadian rhythms in blood pressure regulation and optimization of hypertension treatment with ACE inhibitor and ARB medications. *American Journal of Hypertension*, 24(4), 383-391.
- Holmquist, B., Bünning, P., Riordan, J. F. (1979). A continuous spectrophotometric assay for angiotensin converting enzyme. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 540-548.
- Hooper, N. M., Turner, A. J. (1987). Isolation of two differentially glycosylated forms of peptidyl-dipeptidase A (angiotensin converting enzyme) from pig brain: a re-evaluation of their role in neuropeptide metabolism. *The Biochemical Journal*, 241(3), 625-633.
- Ichihara, A., Kobori, H., Nishiyama, A., Navar, L. G. (2004). Renal renin-angiotensin system. *Contributions to Nephrology*, 143, 117.
- Ichimura, T., Yamanaka, A., Otsuka, T., Yamashita, E., Maruyama, S. (2009). Antihypertensive effect of enzymatic hydrolysate of collagen and Gly-Pro in spontaneously hypertensive rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(10), 2317-2319.
- Imai, T., Miyazaki, H., Hirose, S., Hori, H., Hayashi, T., Kageyama, R., Ohkubo, H., Nakanishi, S. and Murakami, K., (1983). Cloning and sequence analysis of cDNA for human renin precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(24), 7405-7409.
- Iwaniak, A., Minkiewicz, P., Darewicz, M. (2014). Food-originating ACE inhibitors, including antihypertensive peptides, as preventive food components in blood pressure reduction. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 114-134.
- James, P. A., Oparil, S., Carter, B. L., Cushman, W. C., Dennison-Himmelfarb, C., Handler, J., Lackland, D. T., LeFevre, M. L., MacKenzie, T. D., Ogedegbe, O., Smith, S. C., Jr, Svetkey, L. P., Taler, S. J., Townsend, R. R., Wright, J. T., Jr, Narva, A. S., Ortiz, E. (2014). 2014 evidence-based guideline for the management

- of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA*, 311(5), 507–520.
- Kim, S. K., Ngo, D. H., Vo, T. S. (2012). Marine fish-derived bioactive peptides as potential antihypertensive agents. *Advances in Food and Nutrition Research*, 65, 249-260.
- Kitts, D. D., Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1309–1323.
- Kiylik, A., Turkoglu, V., Bas, Z. (2022). Purification of angiotensin-converting enzyme (ACE) from sheep kidney and inhibition effect of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) on purified ACE activity. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 80(1), 115–122.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Li, S., Bu, T., Zheng, J., Liu, L., He, G., Wu, J. (2019). Preparation, bioavailability, and mechanism of emerging activities of Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18 (4), 1097–1110.
- Liang, F., Shi, Y., Shi, J., Zhang, T., Zhang, R. (2021). A novel Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide IAF(Ile-Ala-Phe) from pumpkin seed proteins: in silico screening, inhibitory activity, and molecular mechanisms. *European Food Research and Technology*, 247(9), 2227-2237.
- Lin, S., Liang, R., Xue, P., Zhang, S., Liu, Z., Dong, X. (2017). Antioxidant activity improvement of identified pine nut peptides by pulsed electric field (PEF) and the mechanism exploration. *LWT*, 75, 366-372.
- Lin, Z., Lai, J., He, P., Pan, L., Zhang, Y., Zhang, M., Wu, H. (2023). Screening, ACE-inhibitory mechanism and structure-activity relationship of a novel ACE-inhibitory peptide from *Lepidium meyenii* (Maca) protein hydrolysate. *Food Bioscience*, 52, 102374.
- Ma, T., Fu, Q., Mei, Q., Tu, Z., Zhang, L. (2021). Extraction optimization and screening of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from *Channa striatus* through bioaffinity ultrafiltration coupled with LC-Orbitrap-MS/MS and molecular docking. *Food Chemistry*, 354: 129589.
- Ma, M., Feng, Y., Miao, Y., Shen, Q., Tang, S., Dong, J., Zhang, J. Z. H., Zhang, L. (2023). Revealing the sequence characteristics and molecular mechanisms of ACE inhibitory peptides by comprehensive characterization of 160,000 tetrapeptides. *Foods (Basel, Switzerland)*, 12(8), 1573.
- Majumder, K., Wu, J. (2014). Molecular targets of antihypertensive peptides: understanding the mechanisms of action based on the pathophysiology of hypertension. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), 256-283.
- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., Recio, I., Hernández-Ledesma, B. (2012). Antihypertensive peptides from food proteins: a review. *Food Function*, 3(4), 350–361.
- McGrane, M. M., Essery, E., Obbagy, J., Lyon, J., MacNeil, P., Spahn, J., Van Horn, L. (2011). Dairy consumption, blood pressure, and risk of hypertension: an evidence-based review of recent literature. *Current Cardiovascular Risk Reports*, 5, 287-298.

- Mehta, P. K., Griendling, K. K. (2007). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 292(1), C82–C97.
- Messerli, F. H., Bangalore, S., Bavishi, C., Rimoldi, S. F. (2018). Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors in Hypertension: To Use or Not to Use?. *Journal of the American College of Cardiology*, 71(13), 1474-1482.
- Metzger, R., Bohle, R. M., Pauls, K., Eichner, G., Alhenc-Gelas, F., Danilov, S. M., Franke, F. E. (1999). Angiotensin-converting enzyme in non-neoplastic kidney diseases. *Kidney International*, 56(4), 1442-1454.
- Miguel, M., Gómez-Ruiz, J. Á., Recio, I., Aleixandre, A. (2010). Changes in arterial blood pressure after single oral administration of milk-casein-derived peptides in spontaneously hypertensive rats. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(10), 1422-1427.
- Moon, C., Han, J. R., Park, H. J., Hah, J. S., Kang, J. L. (2009). Synthetic RGDS peptide attenuates lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation by inhibiting integrin signaled MAP kinase pathways. *Respiratory Research*, 10(1), 18.
- Möller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N., Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47(4), 171-182.
- Nelson, D. L., Cox, M. M., 2005. **Lehninger principles of biochemistry**. 3rd ed. Worth Publishers, USA. 1116.
- Page, M. R. (2014). The JNC 8 hypertension guidelines: an in-depth guide. *The American Journal of Managed Care*, 20(1 Spec No.), E8.
- Pantoliano, M. W., Holmquist, B., Riordan, J. F. (1984). Affinity chromatographic purification of angiotensin converting enzyme. *Biochemistry*, 23(5), 1037-1042.
- Paul, M., Poyan Mehr, A., Kreutz, R. (2006). Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiological Reviews*, 86(3), 747-803.
- Petrie, M. C., Padmanabhan, N., McDonald, J. E., Hillier, C., Connell, J. M., McMurray, J. J. (2001). Angiotensin converting enzyme (ACE) and non-ACE dependent angiotensin II generation in resistance arteries from patients with heart failure and coronary heart disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 37(4), 1056-1061.
- Pfeffer, M. A., Braunwald, E., Moyé, L. A., Basta, L., Brown, E. J., Jr, Cuddy, T. E., Davis, B. R., Geltman, E. M., Goldman, S., Flaker, G. C. (1992). Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *The New England Journal of Medicine*, 327(10), 669-677.
- Rezzani, R., Porteri, E., De Ciuceis, C., Bonomini, F., Rodella L. F., Paiardi, S., Boari, G. E., Platto, C., Pilu, A., Avanzi, D., Rizzoni D., Agabiti Rosei, E., (2010). Effects of melatonin and Pycnogenol on small artery structure and function in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 55(6), 1373–1380.
- Sabeur, K., Vo, A. T., Ball, B. A. (2001). Characterization of angiotensin-converting enzyme in canine testis. *Reproduction*, 122(1), 139-146.
- Sánchez A., Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review, *Food Quality and Safety*, 1(1), 29–46,

- Shrikant, S., Raghvendar, S., Shashank, R. (2011). Bioactive peptides: a review. *International Journal Bioautomation*, 15(4), 223-250.
- Singh, B. P., Vij, S., Hati, S. (2014). Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides*, 54, 171–179.
- Thavasu, P. W., Longhurst, S., Joel, S. P., Slevin, M. L., Balkwill, F. R. (1992). Measuring cytokine levels in blood. Importance of anticoagulants, processing, and storage conditions. *Journal of Immunological Methods*, 153(1-2), 115–124.
- Timmermans, P. B., Wong, P. C., Chiu, A. T., Herblin, W. F., Benfield, P., Carini, D. J., Lee, R. J., Wexler, R. R., Saye, J. A., Smith, R. D. (1993). Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacological Reviews*, 45(2), 205–251.
- Toke, A., Meyer, T. W. (2001). Hemodynamic effects of angiotensin II in the kidney. *The Renin-Angiotensin System and Progression of Renal Diseases*, 135, 34-46.
- Turpeinen, A. M., Järvenpää, S., Kautiainen, H., Korpela, R., Vapaatalo, H. (2013). Antihypertensive effects of bioactive tripeptides-a random effects meta-analysis. *Annals of Medicine*, 45(1), 51–56.
- Walther, B., Sieber, R. (2011). Bioactive proteins and peptides in foods. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 81(2), 181.
- Williams, B., Mancia, G., Spiering, W., Agabiti Rosei, E., Azizi, M., Burnier, M., Clement, D. L., Coca, A., de Simone, G., Dominiczak, A., Kahan, T., Mahfoud, F., Redon, J., Ruilope, L., Zanchetti, A., Kerins, M., Kjeldsen, S. E., Kreutz, R., Laurent, S., Lip, G. Y. H., McManus R., Narkiewicz K., Ruschitzka F., Schmieder R.E., Shlyakhto E., Tsioufis C., Aboyans V., Desormais I., ESC Scientific Document Group (2018). 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *European Heart Journal*, 39(33), 3021-3104.
- Wongngam, W., Hamzeh, A., Tian, F., Roytrakul, S., Yongsawatdigul, J. (2023). Purification and molecular docking of angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides derived from corn gluten meal hydrolysate and from *in silico* gastrointestinal digestion. *Process Biochemistry*, 129, 113-120.
- Wu, H. Y., Peng, C. L., Chen, P. C., Chiang, C. K., Chang, C. J., Huang, J. W., Peng, Y. S., Tu, Y. K., Chu, T. S., Hung, K. Y., Chien, K. L. (2017). Comparative effectiveness of angiotensin-converting enzyme inhibitors versus angiotensin II receptor blockers for major renal outcomes in patients with diabetes: A 15-year cohort study. *PloS One*, 12(5), e0177654.
- Xiang, L., Qiu, Z., Zhao, R., Zheng, Z., Qiao, X. (2023). Advancement and prospects of production, transport, functional activity and structure-activity relationship of food-derived angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(10), 1437–1463.
- Xu, Z., Li, W., Han, J., Zou, C., Huang, W., Yu, W., Shan, X., Lum, H., Li, X., Liang, G. (2017). Angiotensin II induces kidney inflammatory injury and fibrosis through binding to myeloid differentiation protein-2 (MD2). *Scientific Reports*, 7, 44911.
- Yatabe, J., Yoneda, M., Yatabe, M. S., Watanabe, T., Felder, R. A., Jose, P. A., Sanada, H. (2011). Angiotensin III stimulates aldosterone secretion from adrenal gland partially via angiotensin II type 2 receptor but not angiotensin II type 1 receptor. *Endocrinology*, 152(4), 1582–1588.

- Yim, H. E., Yoo, K. H. (2008). Renin-Angiotensin system - considerations for hypertension and kidney. *Electrolyte & Blood Pressure : E & BP*, 6(1), 42–50.
- Zarei, M., Ghanbari, R., Zainal, N., Ovissipour, R., Saari, N. (2022). Inhibition kinetics, molecular docking, and stability studies of the effect of papain-generated peptides from palm kernel cake proteins on angiotensin-converting enzyme (ACE). *Food Chemistry. Molecular Sciences*, 5, 100147.
- Zhang, L., Miao, J., Guo, J., Liu, J., Xia, Z., Chen, B., Ma, F., Cao, Y. (2023). Two Novel Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Peptides from Rice (*Oryza sativa* L.) Bran Protein. *Journal of agricultural and food chemistry*, 71(9), 4153–4162.
- Zhang, N., Li F., Zhang T., Li, C. Y., Zhu L., Yan S., (2022). Isolation, identification, and molecular docking analysis of novel ACE inhibitory peptides from *Spirulina platensis*. *European Food Research and Technology*, 248(4), 1107-1115.
- Zou, L., Zhou, Y., Yu, X., Chen, C., Xiao G., (2023). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of two peptides derived from in vitro digestion products of pork sausage with partial substitution of NaCl by KCl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71 (28), 10638-10646.



ÖZ GEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Resul ADANAŞ

Eğitim Bilgileri

Lisans : Fen Bilgisi Öğretmenliği
Üniversite : Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Fakülte : Eğitim Fakültesi
Bölüm : Fen Bilgisi Öğretmenliği
Mezuniyet Yılı : 2007

Yüksek Lisans : Biyoloji Eğitimi
Üniversite : Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Enstitü : Eğitim Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı : Ortaöğretim Fen ve Matematik Alanları Eğitimi Bölümü
Mezuniyet Yılı : 2014

Akademik Yayınlar

- Adanaş, R., Türkoğlu, V., Baş, Z. (2023). Inhibition effect of Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) and Arg-GlyAsp (RGD) bioactive peptides on angiotensin-converting enzyme activity purified from human serum. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13(4), 2847-2860.
- Adanaş, R., Türkoğlu, V., Baş, Z. (2022). The investiagtion of in vitro effect of ascorbic acid (vitamin C) and reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) on acetylcholinesterase enzyme (AChE; EC 3.1.1.7) in human plasma. **4th Eurasia Biochemical Approaches & Technologies (Ebat) Congress**, Antalya, Türkiye.

ETİK KURUL KESİN SONUÇ ONAY BELGESİ



T.C. VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Bazı Biyoaktif Peptidlerin İnsan Serumundan Saflaştırılan Anjiotensin Konverting Enzim (ACE,E.C.3.4.15.1)Aktivitesine Etkisinin Araştırılması				
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	Yok				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Biyokimya				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı				
	DESTEKLEYİCİ	Yok				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	Yok				
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Tüm gözlemsel çalışmalar	☐			
		Anket çalışmaları	☐			
		Doz ve görüntü kayıtları kullanılarak yapılan retrospektif arşiv taramaları ve benzeri gözlemsel çalışmalar	☐			
Kan, idrar, dokü, görüntü gibi biyokimya, mikrobiyoloji, patoloji ve radyoloji koleksiyon materyalleriyle veya rutin muayene, tetkik, tanı ve tedavi işlemleri sırasında elde edilmiş materyallerle yapılacak çalışmalar		☒				
Rutin tetkik ve tedavi işlemleri sırasında elde edilmiş materyallerle yapılacak çalışma		☒				
Hücre veya dokü kültürü çalışmaları		☐				
Gen tedavi klinik araştırmaları dışında kalan ve tanımlamaya yönelik olarak genetik materyalle yapılacak araştırmalar		☐				
Henjiretik faaliyetlerinin sınırı içerisinde yapılacak araştırmalar		☐				
Gıda katkı maddeleriyle yapılacak diyet çalışmaları		☐				
Egzersiz gibi vücut fizyolojisi ile ilgili araştırmalar		☐				
Antropometrik ölçümlere dayalı yapılan çalışmalar	☐					
Yaşam alışkanlıklarının değerlendirilmesi araştırmaları gibi insana bir bekimin doğrudan müdahalesini gerektirmeyen yapılacak olan tüm araştırmalar	☐					
DİĞER :	☐					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐		
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒				
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐				
	YILLIK BİLDİRİM	☐				
	SONUÇ RAPORU	☐				
	DİĞER:	☒ İyi Klinik Uygulamaları Taahhütnamesi, Tüm Araştırmacılara Ait Özgeçmiş, Anabilim Dalı Yazısı, Literatür ve CD				

Sayfa 1/2

Adres : Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Kütüphane Daire Başkanlığı
Tel : 432- 2251701-05
Faks : 432-2251091
e-posta: etikkur@vnu.edu.tr



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
KARAR FORMU

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2022/02-08	Tarih: 11/02/2022
	Prof. Dr. Vedat TÜRKÖĞLÜ sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Bazı Biyoaktif Peptidlerin İnsan Serumundan Safılaştırılan Anjiotensin Konverting Enzim (ACE,E.C.3.4.15.1)Aktivitesine Etkisinin Araştırılması isimli bilimsel araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiştir. Araştırmacıların Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun Çalışma Esasları Hakkında Yönergesinde belirtilen hususları yerine getirdikleri belirlenmiş olup, çalışmalarını ile ilgili tüm sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere, söz konusu çalışmanın gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığına, toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu/oy birliği ile karar verilmiştir.	
	GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
	ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKAN V.UNVANI / ADI / SOYADI:	Doç. Dr. Sermin ALGÜL	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişki	Katılım *	İmza
Doç. Dr. Sermin ALGÜL	Fizyoloji	Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Hülya ÖZDEMİR	Tıbbi Farmakoloji	Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Doç. Dr. Hülya GÜNBAŞAR	Göğüs Hastalıkları	Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Doç. Dr. Hamit Hakan ALP	Tıbbi Biyokimya	Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Dr. Öğr. Üyesi Zeynep KAYA	Tıbbi Biyoloji	Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Cemil FALMAÇ	Periodontoloji	Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Dr. Öğr. Üyesi Necip GÜVEN	Ortopedi ve Travmatoloji	Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Dr. Öğr. Üyesi Fatma DURMAZ	Radyoloji	Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Dr. Öğr. Üyesi Sadi ELASAN	Tıbbi Biyoteknoloji	Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Dr. Öğr. Üyesi Kemal Alp NALCI	Tıbbi Farmakoloji	Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Dr. Öğr. Üyesi Selver KARAASLAN	Hemşirelik	Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Nazlı AKTAŞ YILMAZ	Avukat	Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hukuk Müavirliği	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Derya Dicle ÖZÇİÇEK	Eczacı	Van Eczacılar Odası	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Özge Burak DEĞER	Sağlık Mesleği Mensubu Olmayan Üye	Van Sanayiciler ve İş Kadınları Derneği	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Adnan SELÇUK	Sağlık Mesleği Mensubu Olmayan Üye	Van İl Geliştirme Merkezi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

Sayfa 2/2

Adres : Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Kütüphane Daire Başkanlığı
Tel : 432- 2251701-05
Faks : 432-2251091
e-posta: etikkur@vnu.edu.tr

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tarih. 30/12/2023

Tez başlığı **BAZI BİYOAKTİF PEPTİDLERİN İNSAN SERUMUNDAN SAFLAŞTIRILAN ANJİOTENSİN KONVERTİNG ENZİM (ACE, E.C.3.4.15.1) AKTİVİTESİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışmamın, kapak sayfası, giriş, ana bölümler ve sonuç bölümlerinden oluşan toplam 88 (seksen sekiz) sayfalık kısmına ilişkin, 30/12/2023 tarihinde tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre tezimin benzerlik oranı % 19 (yüzde on dokuz) dur.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

30/12/2023
Tarih ve imza

Adı soyadı: Resul ADANAŞ

Öğrenci no: 179100002147

Anabilim dalı: Kimya

Programı: Biyokimya

Statüsü: () Yüksek lisans (X) Doktora

DANIŞMAN
Prof. Dr. Vedat TÜRKOĞLU

ENSTİTÜ ONAYI

UYGUNDUR

UYGUNDUR